

Induktion Tumorantigen-spezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten in vitro und in vivo

Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt am Institut für Molekulare Immunologie
Helmholtz Zentrum München
unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Dolores J. Schendel/
Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

vorgelegt von
Carina Wehner
München, den 01. Juli 2013

Erstgutachter:

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Zweitgutachter:

Herr PD Dr. Josef Mautner

Mitgutachter:

Herr Prof. Dr. Heinrich Jung

Herr Prof. Dr. Michael Schleicher

Einreichung der Dissertation am:

01. Juli 2013

Tag der mündlichen Prüfung:

10. Dezember 2013

Don't lose faith. [...] The only way to do great work is to love what you do.

Steve Jobs

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	9
Summary	11
1 Einleitung	13
1.1 Vorkommen und Häufigkeit von Krebs	13
1.2 Ursachen und Entwicklung von Krebs	13
1.3 Krebstherapien	16
1.4 T-Zellentwicklung und Reifung zu aktivierten Effektor-T-Zellen	20
1.5 Tumor-Testis-Antigene (TTA oder CTA, <i>cancer-testis-antigens</i>)	24
1.6 Ausgewählte Tumor-Testis-Antigene	25
1.7 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Material	29
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	29
2.2 Enzyme, Zytokine und sonstige Reagenzien	31
2.3 Kommerzielle Analysesysteme	34
2.4 Kulturmedien	35
2.5 Puffer und Lösungen	36
2.6 Zelllinien und Bakterien	36
2.7 Plasmide, Tetramer, Primer und Oligonukleotide	37
2.8 Klonierte T-Zell-Rezeptoren	43
2.9 Peptide und Proteine	43
2.10 Antikörper	44
2.11 Personen	45
2.12 Verwendete Software	45
3 Methoden	46
3.1 Zellbiologische Methoden	46
3.1.1 Bestimmung der Zellzahl	46
3.1.2 Einfrieren von Zellen	46

3.1.3 Auftauen von Zellen.....	46
3.1.4 Generierung von Mini-LCL-Zelllinien.....	47
3.1.5 Kultivierung von LCL/Mini-LCL-Zelllinien.....	47
3.1.6 Kultivierung von adhären Ten Tumorzellen.....	48
3.1.7 Kultivierung von Suspensionszellen.....	48
3.1.8 Kultivierung etablierter T-Zellklone.....	48
3.1.9 Anreicherung von humanen mononukleären Zellen des Blutes (PBMZ).....	49
3.1.10 Generierung von 3-Tage DZ (3d-DZ).....	49
3.1.11 Ivt-mRNS-Transfektion verschiedener Zelltypen.....	50
3.1.12 Peptid-Beladung von LCL.....	51
3.1.13 De-novo-Induktion naiver CD8 ⁺ T-Zellklone.....	51
3.1.14 Kultivierung sortierter CD8 ⁺ T-Zellklone.....	51
3.1.15 Koinkubation von T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APZ).....	52
3.1.16 Kultivierung adhären ter HEK-293T-Zellen.....	52
3.1.17 Transfektion von HEK-293T-Zellen.....	52
3.1.18 Transduktion von Jurkat-76-Zellen.....	53
 3.2 Molekularbiologische Methoden.....	 54
3.2.1 Bakterienstamm und -kultur.....	54
3.2.2 DNS-Amplifikation mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	54
3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNS.....	54
3.2.4 DNS-Extraktion aus Agarosegelen.....	54
3.2.5 Sequenzierung.....	55
3.2.6 DNS-Restriktionsverdau	55
3.2.7 Oligomer-Hybridisierung.....	55
3.2.8 Ligation von DNS-Fragmenten.....	56
3.2.9 Generierung der Vektorkonstrukte.....	56
3.2.10 Herstellung elektrokompeter <i>Escherichia coli</i> Bakterien.....	57
3.2.11 Transformation elektrokompeter Bakterien mit Plasmid-DNS.....	58
3.2.12 Selektion und Expression der transformierten Bakterien.....	58
3.2.13 Plasmid-DNS-Extraktion aus transformierten Bakterien.....	59
3.2.14 Herstellung von Einzel-Spezies-ivt-mRNS.....	59
3.2.15 Agarose-Gelelektrophorese von ivt-mRNS-Produkten.....	59
3.2.16 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	60
3.2.17 HLA-Typisierung.....	60

3.3 Analytische Methoden	60
3.3.1 Funktioneller IFN- γ -ELISA	60
3.3.2 Funktionelle Analyse von Effektorzellen mittels ELISpot	61
3.4 Durchflusszytometrische Analysen	61
3.4.1 Färbung von Oberflächenmolekülen	61
3.4.2 Färbung intrazellulärer Proteine	62
3.4.3 Tetramerfärbung	62
3.4.4 CD137-Färbung auf reaktivierten CD8 ⁺ T-Zellen	63
3.4.5 Sortierung CD137-positiver CD8 ⁺ T-Zellen	63
3.5 Analyse verschiedener RNS-Spezies in Zellen	64
3.5.1 Isolierung zellulärer Gesamt-RNS	64
3.5.2 Reverse Transkription von mRNS zu cDNS	64
3.5.3 PCR zur Analyse von TZR α -Sequenzen	64
3.5.4 Analysen klonaler TZR β -Sequenzen mit Hilfe degenerierter Primer	65
3.5.5 Expressionsanalyse von Tumor-Testis-Antigenen in unterschiedlichen Zelltypen mittels quantitativer <i>Real-Time</i> PCR	66
3.6 In-vivo-Experiment: NOD/scid IL-2R γ^{null} (NSG) Mausmodell	68
3.6.1 Vakzinierung von NSG-Mäusen	68
3.6.2 Post-mortem-Untersuchung und -Präparation von Milzzellen	69
3.6.3 Kultivierung der Milzzellen	69
3.6.4 Abbruchkriterien für das NSG-Mausexperiment	69
4 Ergebnisse	71
4.1 Etablierung einer Methode zur De-novo-Induktion Antigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	71
4.1.1 Prinzip der De-novo-Induktion von Tumor-Testis-Antigen (TTA)-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	71
4.1.2 Wahl der Zielantigene	73
4.1.3 Sortierung von aktivierten Antigen-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	78
4.1.4 De-novo-Induktion von TTA-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen mittels CrossTag-ivt-mRNS	80
4.1.4.1 Zeitliche Übersicht der T-Zell-De-novo-Induktion	80
4.1.4.2 Analyse der Ausgangs-Zellpopulationen	82

4.1.4.3 Restimulation und Klonierung TTA-reaktiver CD8 ⁺ T-Zellen	84
4.1.5 Überprüfung der TTA-Spezifität von isolierten CD8 ⁺ T-Zellklonen	86
4.1.6 Weitere Charakterisierung TTA-spezifischer TZR	90
4.1.6.1 Verwendung einer TZR-Bibliothek für den Einsatz transgener TZR	90
4.1.6.2 Etablierung von geeigneten Testsystemen zur Analyse von transgenen TZR	92
4.1.6.2.1 CD8 ⁺ T-Zellen als TZR-Rezipienten	93
4.1.6.2.2 PBL als tgTZR-Rezipienten-Zellen	96
4.1.6.3 Analyse des XAGE-1-spezifischen TZR-M244	100
4.1.6.3.1 Identifizierung der Antigen-Spezifität	100
4.2 Induktion Antigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen in vivo	103
4.2.1 Überblick über die Aktivierung Antigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen im NSG-Mausmodell	104
4.2.2 Antigenexpression und Stimulationsfähigkeit transfizierter mDZ	105
4.2.3 Analyse der Ausgangs-Zellpopulation	107
4.2.4 Analyse der Milzpopulation nach zweimaliger DZ-Vakzinierung	110
4.2.5 Analyse der in vitro restimulierten Milzzellen	114
4.2.5.1 Zellzusammensetzung und Melan-A _(ELA) -Spezifität humaner PBMZ nach Kultivierung	114
4.2.5.2 Funktionsanalyse Melan-A-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	117
5 Diskussion	119
5.1 De-novo-Induktion Tumor-Testis-Antigen(TTA)-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen in vitro	119
5.1.1 Aufbau des In-vitro-Kokulturansatzes	119
5.1.2 Durchführung der De-novo-Induktion und CD137-Sortierung	122
5.1.3 Identifizierung TTA-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellklone	125
5.1.4 Hintergründe der Problematik der Expansion von CD8 ⁺ T-Zellklonen	126
5.1.5 Testsystem zur Charakterisierung TTA-spezifischer TZR	129
5.1.6 Charakterisierung des XAGE-1-spezifischen TZR M244	131
5.2 Eignung von TTA als Zielantigene für die Tumorthherapie	132
5.3 Induktionskapazität der CrossTA _g -Antigen-ivt-mRNS-transfizierten mDZ in vivo	135

5.3.1 NSG-Mäuse als Grundlage eines humanisierten In-vivo-Modells.....	135
5.3.2 Versuchsablauf und Durchführung.....	136
5.3.3. Verbesserte DZ-Vakzine durch Verwendung der CrossTAg-ivt-mRNS- Sequenzen.....	138
5.4 Die Rolle der CD4 ⁺ T-Zellhilfe für die Induktion und Expansion Antigen- spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen.....	140
5.5. Ausblick.....	143
6 Literaturverzeichnis.....	146
7 Abkürzungsverzeichnis.....	163
8 Anhang.....	166
Danksagung.....	174
Lebenslauf.....	176
Eidesstattliche Erklärung.....	178

ZUSAMMENFASSUNG

Die personalisierte Immuntherapie ist ein innovatives und viel versprechendes Feld im Bereich der Krebstherapie. Beispielsweise führte der adoptive Transfer von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen oder die Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen (DZ) bei einigen wenigen Patienten zum Rückgang der Tumoren. Beide Immuntherapien können jedoch optimiert werden. Eventuell könnte auch die Kombination von beiden Therapieansätzen zu einer verbesserten Tumorabwehr führen.

Tumor-assoziierte Antigene stellen meist von Tumoren überexprimierte Selbst-Antigene dar, die von Selbst-MHC-Molekülen präsentiert werden. Um Autoimmunität zu verhindern, werden jedoch T-Zellen, die einen hoch-affinen T-Zellrezeptor (TZR) tragen, im Thymus negativ selektiert. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass tumorreaktive T-Zellen isoliert werden können, die ein Tumorantigen im Zusammenhang eines fremden MHC-I-Moleküles erkannten. Mit dieser Methode können eine Vielzahl von hoch-affinen TZR generiert werden, die in periphere Blutlymphozyten der Patienten transferiert werden können, um diese für die Tumorabwehr zu befähigen. Hierfür wurden in unserer Arbeitsgruppe angereicherte CD8⁺ T-Zellen und autologe DZ verwendet, die mit in vitro transkribierter (ivt) RNS transfiziert wurden, welche für ein allogenes MHC-I-Allel, sowie ein Tumorantigen codierte.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode, die den Gedanken des allorestingierten Induktionsansatzes von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen unter Verwendung von mehreren Tumor-Testis-Antigenen (TTA), präsentiert auf verschiedenen allogeenen MHC-Molekülen, weiterführte. So wurden entweder periphere Blutlymphozyten oder DZ von zwei Spendern eingesetzt, die sich in mehreren MHC-Allel unterschieden.

Die Wahl der Kandidaten-Antigene erfolgte anhand des untersuchten Expressionsprofils sechs verschiedener TTA (cTAGE-1, GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX4 und XAGE-1) in verschiedenen Zelltypen mittels quantitativer *real-time* PCR. Aufgrund des universalen Nachweises von cTAGE-1-RNS in den untersuchten Zellen, wurde dieses Antigen für den Induktionsansatz nicht verwendet.

Um die in der Literatur häufig beschriebene essentielle CD4⁺ T-Zellhilfe für die Induktion von TTA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu erhalten, wurden die Zielantigene an die Signalsequenzen von DC-LAMP und LAMP-1 (CrossTA_g) gekoppelt und dadurch die Präsentation der Antigene auf MHC-I und -II ermöglicht. So konnte für jedes eingesetzte Zielantigen ein spezifischer CD8⁺ T-Zellklon isoliert werden. Exemplarisch wurden die TZR-Sequenzen eines T-Zellklons analysiert und transgen in geeignete Effektor-Rezipienten-T-Zellen transferiert, wodurch die XAGE-1-Spezifität bestimmt werden konnte.

Außerdem wurde die effiziente Induktion von CD8⁺ T-Zellen in Abhängigkeit der CrossTA_g-Sequenzen anhand eines humanisierten Mausmodelles untersucht. NOD/scid IL2R γ^{null} (NSG)-

Mäuse, die defizient in T-, B- und NK-Zellen sind, wurden mit humanen mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) rekonstituiert und anschließend zweimal mit DZ vakziniert, die entweder mit herkömmlicher Melan-A-ivt-mRNS oder mit CrossTA_g-Melan-A-ivt-mRNS transfiziert worden waren. Es konnte gezeigt werden, dass DZ Melan-A im Zusammenhang mit CrossTA_g-Sequenzen eine signifikant überlegene Induktionskapazität von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aufwies. Dies drückte sich in einer stärkeren Proliferation sowie höheren IFN- γ -Ausschüttung nach spezifischer Aktivierung von Melan-A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus.

In dieser Arbeit wurde die erfolgreiche Induktion von Tumorantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen unter Verwendung der CrossTA_g-Sequenzen sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt. Da aufgrund der vielfältigen Krebsursachen und Tumorfluchtmöglichkeiten ein Therapieansatz alleine vermutlich für eine erfolgreiche Heilung von Krebspatienten nicht ausreicht, könnte der parallele Einsatz der in dieser Arbeit zugrunde liegenden Therapieansätze, nämlich der adoptive Transfer transgen-modifizierter Tumorantigen-spezifischer T-Zellen sowie die Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen DZ, die Erfolgchancen in der Bekämpfung von Tumoren erhöhen.

SUMMARY

Personalised immunotherapy for tumor treatment is a promising strategy that is gaining broad interest in the field of cancer therapy. Using either adoptive transfer of patient-derived tumor-specific T-cells or applying dendritic cell (DC) vaccines loaded with tumor antigens has led to tumor remission in a small number of cases. However, these two forms of immunotherapy as used to date have room for improvement so that more patients can receive clinical benefit.

T-cells expressing a high-affinity TCR recognizing self-antigens on self-MHC molecules are eliminated by negative selection in the thymus to avoid autoimmunity. Since tumor-associated antigens are often over-expressed self-antigens presented on self-MHC molecules, an alternative is to induce allo-reactive T-cells, which recognize antigens presented by foreign MHC molecules to bypass this central tolerance. These T-cells then serve as sources of high-affinity TCR that can be used to engineer patient-derived lymphocytes to express a new tumor specificity. Therefore, the semi-allogeneic priming approach established in our group paved the way to isolate T-cells with high-affinity TCR by priming CD8-enriched T-cells with DC which were simultaneously transfected with one *in-vitro*-transcribed (*ivt*) RNA coding for a tumor antigen and one coding for an allogeneic MHC-I molecule.

To pursue and further extend the scope of semi-allogeneic priming, a method to simultaneously induce CD8⁺ T-cells specific for one of several different cancer-testis antigens (CTA) presented by one of several different allogeneic MHC molecules was established (multi-allogeneic approach), providing the possibility to overcome limitations of obtaining high-affinity TCR restricted by molecules encoded by only one foreign MHC-I allele. Therefore, two donors dissimilar in several MHC-I alleles served as the sources of antigen-presenting cells and responding peripheral blood lymphocytes, respectively.

The target-antigens were selected from a group of six different CTA: cTAGE-1, GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX4 and XAGE-1. As the expression analysis by quantitative real-time PCR revealed a ubiquitous incidence of cTAGE-1 mRNA in all cell-types examined, cTAGE-1 was excluded from the list of appropriate candidates for use in T-cell priming. Furthermore, target antigens were linked to signaling sequences adopted from LAMP-1 and DC-LAMP (CrossTA_g), thereby enabling antigen-presentation on MHC-I as well as on MHC-II. This allowed CD4⁺ T-cell help to be provided for the induction of antigen-specific CD8⁺ T-cells. Thus, T-cells specific for all five CTA were generated and analyzed with respect to their TCR sequences. One exemplary TCR was reconstructed and introduced into appropriate effector recipient T-cells. By this means, the XAGE-1-specificity of this TCR could be identified.

Subsequently, the efficiency of induction of Melan-A-specific T-cells achieved by introducing *ivt*-mRNA into DC using the CrossTA_g-vector was compared with DC transfected with the standard Melan-A-*ivt*-mRNA in an *in vivo* DC vaccination model. Here a humanized mouse model was used.

Thus, NOD/scid IL2R γ^{null} (NSG) mice lacking T-, B- and NK-cells were engrafted with human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and vaccinated twice with DC loaded either with CrossTA γ -Melan-A-*ivt*-mRNA or with Melan-A-*ivt*-mRNA. The results revealed a superior induction-capacity of DC expressing CrossTA γ -linked Melan-A-*ivt*-mRNA, as demonstrated by a significantly higher proliferation and activation-induced IFN- γ secretion by Melan-A-specific CD8 $^{+}$ T-cells.

Induction of tumor-antigen specific CD8 $^{+}$ T-cells was achieved by introducing CrossTA γ -sequences linked to target antigens *in vitro* as well as *in vivo*. Faced with very diverse mechanisms of cancer development and tumor escape, the use of only one form of immunotherapy may not be sufficient for a successful cure of many cancers. By providing a combination therapy that includes both DC vaccination and use of TCR-engineered lymphocytes for adoptive T-cell transfer may enhance the chances of success.

1 EINLEITUNG

1.1 Vorkommen und Häufigkeit von Krebs

Die älteste uns bekannte Beschreibung von Krebs in der Geschichte der Menschheit geht zurück auf etwa das Jahr 3000 vor Christus, auf das aus dem frühen Ägypten stammende Edwin Smith Papyrus. Der Autor erwähnt einen wuchernden Brusttumor und erklärt, dass dies eine nicht behandelbare Erkrankung sei. Der Begriff „Krebs“ wurde von Hippocrates (460 – 370 v. Chr.) geprägt, der das griechische, die Schalentiere bezeichnende Wort „καρκίος“ aufgrund des krebs-ähnlichen Aussehens der malignen Zellen auf die Tumoren übertrug (Hajdu, 2011).

Definiert wird Krebs über das unkontrollierte Wachstum von einst normalen Körperzellen, die in gesundes Gewebe eindringen und in manchen Fällen über das Blut- oder Lymphsystem in andere Teile des Körpers gelangen können, die sog. Metastasierung. Normale Zellen teilen sich kontrolliert und sterben nach einiger Zeit. Die Entwicklung von Tumorzellen ist ein mehrstufiger Prozess, der mit mehreren zellulären Veränderungen einhergeht, so dass sie beispielsweise die Eigenschaften gewinnen, unter Umgehung des Zelltodes unaufhörlich wachsen zu können (Dugdale, 2012; WHO, 2013).

Im Jahre 2011 war laut Statistischem Bundesamt Krebs mit 26 % die zweit häufigste Todesursache in Deutschland und machte damit mehr als ein Viertel aller Todesfälle aus. Weltweit standen 2008 maligne Erkrankungen nach kardiovaskulären und infektiösen Erkrankungen an dritter Stelle der Todesursachenstatistik – in Zahlen waren dies 7,6 Millionen Menschen, die der häufig tödlich verlaufenden Erkrankung erlagen. Es starben mehr Männer als Frauen an Krebs, wobei der Häufigkeitsgipfel bei beiden Geschlechtern zwischen 70 und 79 Jahren liegt. Bis zum Jahre 2030 wird ein Anstieg der durch Krebs verursachten Todesfälle auf 13,1 Million prognostiziert. Zu den am häufigsten vorkommenden Krebsarten zählen Lungen-, Magen-, Leber-, Darm- und Brustkrebs (WHO, 2011). In Deutschland ist bei Männern hauptsächlich die Lunge betroffen, gefolgt von Darm-, Prostata-, Bauchspeicheldrüse-, Magen- und Lebererkrankungen. Bei Frauen ist Brustkrebs führend, dicht gefolgt von Darm- und Lungenkrebs (Robert Koch-Institut, 2012).

Generell gibt es viele verschiedene Krebsarten, da jedes Organ und Gewebe betroffen sein kann. So mannigfaltig die Arten sind, genauso vielfältig sind die Ursachen für die Entstehung verschiedenster maligner Entartungen, die im folgenden Kapitel kurz umrissen werden sollen.

1.2 Ursachen und Entwicklung von Krebs

Die Liste der Krebserkrankungen und deren unterschiedlicher Ursachen ist lang. Sie resultiert aus

dem Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen, welches in der Bildung von malignem Gewebe enden kann. Auf genetischer Ebene spielen sog. Onkogene, Tumorsuppressorgene und genomstabilisierende Gene eine wichtige Rolle. Werden diese Gene durch Mutationen verändert, kann dies zur Entartung normaler Zellen führen, wie es beispielsweise bei Proto-Onkogenen der Fall ist, sollten diese zu Onkogenen transformiert werden (Zitvogel et al., 2008; Chial, 2008). Proto-Onkogene kodieren meist für Proteine, die Zellteilung stimulieren, Zelldifferenzierung inhibieren oder Zelltod blockieren (Chial, 2008).

Äußere Faktoren können für Mutationen ursächlich sein. So ermöglichte zwar die sauerstoffreiche Umgebung die Entwicklung mehrzelliger Lebewesen, jedoch werden aerobe Organismen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt, Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Schäden gefördert und schlussendlich kann Mutagenese induziert werden (Maynard et al., 2009). Pro Tag muss jede Zelle etwa 10 000 oxidative Attacken auf die DNS abwehren. Daher entwickelten sich coevolutionär zum aeroben Metabolismus antioxidative Schutzmechanismen als Anpassung auf Protein- und DNS-Schäden, die durch freie Radikale verursacht werden (Dreher und Junod, 1996; Pham-Huy et al., 2008). Allerdings sind auch Reparaturmechanismen fehlerbehaftet, so dass im Laufe eines Lebens Schäden akkumulieren und zu Krebs führen können. Daher ist Alter ebenfalls ein Risikofaktor für Krebsentstehung. Daneben können freie Radikale durch UV- oder ionisierende Strahlung, aber auch durch Zigarettenrauch und Fettsäuren in Nahrungsmitteln gebildet werden (Dreher und Junod, 1996; WHO, 2011).

Vieles deutet darauf hin, dass virale, bakterielle oder parasitäre Infektionen mit der Entwicklung von Tumoren assoziiert sind. Peyton Rous entdeckte 1910 erstmals den Zusammenhang zwischen Tumorentstehung und einer Virusinfektion in Hühnern (Rous, 1910 zitiert in Chial, 2008). Heutzutage spricht man 20% aller Krebsursachen durch Viren verursachten Mutationen zu, denn virale Gene können durch ihren Einbau in das Wirtsgenom Onkogene anschalten oder Chromosomentranslokationen bewirken, wodurch Fusionsproteine entstehen können, die wiederum die Zellteilung stimulieren (Chial, 2008; De Mitri et al., 2010). Bakterielle oder parasitäre Infektionen mit *Helicobacter pylori* oder *Schistosoma haematobium* können zur chronischen Entzündung und dadurch zu oxidativem Stress führen, wodurch ein verändertes Verhalten von Körperzellen, die Proliferation bzw. Apoptose betreffend, eingeleitet werden kann und das Krebsrisiko erhöht wird (Pagano et al., 2004; Adams et al., 2007; Roithmaier et al., 2007; Fried et al., 2011).

Nach Induktion von Malignität-verursachenden Mutationen, müssen diese Zellen verschiedene Abwehrmechanismen überwinden, um sich im Körper etablieren zu können. Hierbei unterscheidet man zwischen intrinsischen (zellautonomen) und extrinsischen (immunvermittelten) Barrieren (Zitvogel et al., 2006). Zur Überwindung intrinsischer Abwehrmechanismen gehört das Erlangen von Fähigkeiten, die es den Krebszellen erlauben, ungehindert zu wachsen. So benötigen sie zunächst Wachstumsfaktoren, die viele maligne Zellen selbst synthetisieren (autokrine Stimula-

tion). Einige dieser Faktoren stimulieren nicht nur die Proliferation, sondern inhibieren auch gleichzeitig das Immunsystem. Auf der anderen Seite müssen Tumorzellen insensitiv gegenüber Signalen sein, die das Wachstum hemmen. Ein entscheidendes Zytokin hierbei ist TGF- β (transforming growth factor- β), das in Normalgewebe für Homöostase verantwortlich ist, da es die Expression von Proliferation-vermittelnden Genen unterdrückt oder Zellzyklusarrest induziert (Zitvogel et al., 2006).

Vermeidung des programmierten Zelltodes und uneingeschränktes Replikationspotential sind ebenfalls essentielle Attribute. Hierfür entwickeln die Zellen Resistenzen gegenüber Apoptose-induzierenden Effektormolekülen oder überexprimieren anti-apoptotische Moleküle bzw. aktivieren die Synthese von Telomerasen, die die Aufgabe haben, sog. Telomere an DNS-Enden anzufügen, um diese vor Abbau während der Replikation zu schützen. Hinweise auf solche Mechanismen lieferten aus Krebspatienten isolierte zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL), die im Gegensatz zu gesunden Menschen spezifisch anti-apoptotische Moleküle erkannten (Zitvogel et al., 2006).

Wurden diese Hürden einmal genommen, kommt der extrinsische Schutzmechanismus in Form der Immunabwehr zum Tragen. Paul Ehrlich sprach Anfang des 20. Jahrhunderts das erste Mal von der Hypothese einer Tumorüberwachung durch das Immunsystem (Ehrlich, 1909 zitiert in Zitvogel et al., 2008). Mit Immunüberwachung wird das Zusammenspiel von angeborenem und erworbenem Immunsystem zur Erkennung und Eliminierung von anormalen Zellen bezeichnet. In Mausexperimenten wurde gezeigt, dass immundefiziente Mäuse, denen Zellen des adaptiven Immunsystems fehlten und nicht auf das für die Aktivierung des Immunsystems essentielle Zytokin Interferon (IFN)- γ reagieren konnten (Rag2^{-/-} γ c^{-/-}), nach Injektion von murinen Krebszellen häufiger Tumoren entwickelten als ihre immunkompetenten Artgenossen (Senovilla et al., 2012).

Als Antwort auf die Fragestellung, wie Tumoren angesichts der Rolle des Immunsystems in der Tumorüberwachung in gesunden Menschen entstehen können, kristallisierte sich das Modell der Immuneditierung heraus. Darunter ist der Prozess zu verstehen, der zur Immuntoleranz führt und in drei Phasen gegliedert ist: 1) Tumorüberwachung, 2) Gleichgewicht zwischen Immunsystem und Tumor und 3) Immunevasion (Schreiber et al., 2011).

Anfangs werden entartete Zellen vom Immunsystem erkannt und eliminiert. Verschiedene Studien mit Mäusen zeigten, dass dem eine koordinierte Aktivierung des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems zugrunde liegt, denn das Fehlen von T-, B- und natürlichen Killer (NK)-T-Zellen in Rag2^{-/-} oder Rag1^{-/-} Mäusen, führte zur verstärkten Tumorentwicklung. Ähnlich verhielt es sich in Abwesenheit von Eosinophilen, Zellen des angeborenen Immunsystems, wodurch die Tumorlast erheblich erhöht wurde (Dunn et al., 2006; Simson et al., 2007; Marr et al., 2012).

Nicht immer können alle Tumorzellen vollständig eliminiert werden. Das Immunsystem übt einen starken Selektionsdruck auf genetisch instabile Tumorzellen aus, so dass nur diejenigen überleben, die vor Angriffen von Seiten der Immunzellen resistenter sind und persistieren können. So stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem ein, in dem die

Krebszellen am weiteren Wachstum gehindert werden. Diese Phase wird als die am längsten andauernde Periode beschrieben und kann mehrere Jahrzehnte fortbestehen oder an diesem Punkt enden und nicht weiter voranschreiten. In diesem Stadium ist nur das adaptive, nicht aber das angeborene Immunsystem von Bedeutung (Koebel et al., 2007; Marr et al., 2012). Mausexperimente zeigten ferner, dass das Immunsystem die Immunogenität der Tumoren bedingt, denn Tumoren konnten sich nur etablieren, wenn sie von einer immunkompetenten Maus in eine andere transferiert wurden, nicht jedoch wenn sie aus immundefizienten Mäusen stammten. Das bedeutet, dass durch die Immunselektion Tumorvarianten entstanden sind, die dem Immunsystem widerstehen konnten, indem sie eine geringe Immunogenität aufwiesen (Shankaran et al., 2001; Schreiber et al., 2011; Vesely et al., 2011).

Tumorflucht kann dann erfolgen, wenn sich Tumorzellen entweder derart stark verändern, dass das Immunsystem sie nicht mehr kontrollieren kann, oder aber das Immunsystem zu schwach ist um den Tumor in Schach zu halten. Verschiedene Mechanismen können hierbei eine Rolle spielen. Die Herunterregulierung des Haupthistokompatibilitätskomplexes I (*major histocompatibility complex I*, MHC-I), eine verringerte Präsentation von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA), ein immunsuppressives Milieu und die Expression oder das Fehlen von kostimulatorischen Molekülen, die Immunzellen anerg werden lassen oder abtöten, sind einige Beispiele, die die Eliminierung von Krebszellen erheblich erschweren und zu einer klinisch relevanten Tumorerkrankung führen (Zitvogel et al., 2006; Schreiber et al., 2011).

1.3 Krebstherapien

Dort, wo das Immunsystem gegen den Tumor kapituliert, versucht der Mensch seit jeher mittels verschiedenster Therapiestrategien der Erkrankung Herr zu werden. Bereits Aulus Celsus (25 v. Chr. - 50 n. Chr.) schlug eine frühzeitige operative Entfernung von malignem Gewebe vor, da ihm bereits die Möglichkeit einer Metastasenbildung bekannt war (Hajdu, 2011). Zu den weiteren klassischen Behandlungsmethoden, die sich im Laufe der Zeit entwickelten, zählen Bestrahlungs- und Chemotherapie, die oft aber keinen dauerhaften Heilungserfolg zeigen. Daher wird intensiv nach alternativen Therapiemöglichkeiten in verschiedenste Richtungen gehend gesucht. Die ersten Versuche eines immuntherapeutischen Ansatzes fanden im Jahre 1890 statt, als William B. Coley mit Hilfe von bakteriellen Adjuvantien das Immunsystem gegen inoperable Tumoren mobilisierte (Kirkwood et al., 2012).

Dendritische Zellen (DZ), als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem, sind ausgezeichnete Antigen-präsentierende Zellen und werden daher zu den hoffnungsvollen Vakzinierungsstrategien gezählt. Bestrahlungs- und Chemotherapie zeigten zusammen mit DZ-Vakzinierungen einen synergistischen Effekt. Geringe Strahlendosen führen beispielsweise zu

einer erhöhten MHC-I-Expression und Tumorantigen-Präsentation auf Tumorzellen, Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen sind verstärkt vorhanden sowie der Apoptose-induzierende Fas-Rezeptor CD95 wird von Tumorzellen vermehrt exprimiert. Des Weiteren können Tumor-Antigene von toten Tumorzellen durch DZ aufgenommen, präsentiert und T-Zellen aktiviert werden (Zitvogel et al., 2008).

Viele Studien beschäftigen sich diesbezüglich mit DZ, die mit Tumorlysaten beladen werden und entweder als alleinige Komponente, oder zusammen mit z.B. Zytokinen (Interleukin (IL)-2), oder vorangegangener Bestrahlung und/oder Chemotherapie verabreicht werden. Toxische Nebenwirkungen wurden nur in sehr geringem Umfang beobachtet. Gliederschmerzen, Kraftlosigkeit, Übelkeit, Fieber und Schmerzen an der Injektionsstelle kamen zuweilen vor. In einigen Studien konnte eine zelluläre Immunantwort nach Vakzinierung, basierend auf dem DTH-Test (*delayed type IV hypersensitivity*), bei dem Tumorlysate in die Haut gespritzt werden, um die Immunreaktion anhand des Ausmaßes der Schwellung zu messen, oder anhand des Zytokinprofils im Blutserum der Patienten, beobachtet werden (Ardon et al., 2012; Galluzzi et al., 2012).

Als Variante werden DZ mit aufgereinigten oder synthetisch hergestellten TAA-Peptiden beladen. Wie schon bei den Tumorlysate-beladenen DZ sind unerwünschte Nebeneffekte gering und eine T-Zellantwort konnte beobachtet werden. Obwohl diese Studien zeigen konnten, dass Peptid- oder Tumorlysate-beladene DZ für Patienten eine „sichere“ Vakzine darstellen und eine Immunantwort induziert werden konnte, beschränken sich die Erfolge bislang auf die Verzögerung des Voranschreitens der Erkrankung (Galluzzi et al., 2012). Eine Schwierigkeit der exogen beladenen DZ ist der hohe Umsatz des Peptid-MHC, sodass möglicherweise nur wenige TAA auf der Oberfläche der DZ zu finden sind, wenn diese die Lymphknoten erreicht haben (Banchereau und Palucka, 2005). Die Beladung mit nur einem TAA-Peptid fördert außerdem die Selektion auf Tumorvarianten, die das ausgewählte Peptid nicht präsentieren (Frankenberger und Schendel, 2012).

Alternativ können DZ mit Ribonukleinsäure (RNS), die für TAA codiert, beladen werden. Eine Immunantwort des angeborenen (NK-Zellen) und adaptiven (WT-1-spezifische CD8⁺ T-Zellen) Immunsystems zeigten 50% der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), die Wilms' tumor 1 Protein (WT1)-RNS-transfizierte DZ appliziert bekamen. Eine vollständige Remission erlebten 40% der Patienten, die auf die Vakzine ansprachen (Van Tendeloo et al., 2010). Nach einer erfolglosen Operation und einer ebenso erfolglosen Chemotherapie wurde eine Patientin über drei Jahre hinweg wiederholt mit DZ, die mit der humanen Telomerase-reverse-Transkriptase (hTERT)-RNS transfiziert worden waren, behandelt. Die induzierte Immunantwort ging mit einem vollständigen Rückgang des Pankreaskarzinoms einher (Suso et al., 2011). Trotz Induktion einer Immunantwort kann eine Tumorregression oft nur in vereinzelten Patienten erreicht werden. Mögliche Gründe dafür sind eine geringe Avidität der T-Zellen zum TAA, eine geringe Zytotoxizität oder schlechte Migrationsfähigkeit der ZTL zum Tumor aufgrund geringer Chemokinmengen bzw. Hemmung der Effektor-T-Zellen infolge inhibitorischer Signale im Tumormilieu als Resultat von

Tumorfluchtmechanismen (Himoudi et al. 2012).

Neben der aktiven Immunisierung mit DZ, stellt die passive Immunisierung mit Hilfe des adoptiven Transfers Tumorantigen-spezifischer T-Zellen (adoptiver T-Zelltransfer, ATZT) eine alternative Herangehensweise dar. Die Idee des adoptiven Zelltransfers (AZT) wird schon seit mehreren Jahrzehnten in z.B. Mausmodellen untersucht (Restifo et al., 2012). Der erste große Fortschritt im Hinblick auf AZT wurde 1988 bei der Behandlung von 20 Patienten mit metastasierenden Melanom erzielt. Diesen wurden autologe Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) und IL-2 nach Lymphozytendepletion appliziert (Marr et al., 2012). Idealerweise werden autologe oder allogene Lymphozyten ex vivo expandiert, gegebenenfalls modifiziert, so dass sie eine höhere Spezifität gegen TAA aufweisen, und dem Patienten wieder zurück gegeben (Rosenberg et al., 2008). Problematisch beim Einsatz von TIL ist zum einen die Übertragbarkeit auf andere Krebsarten, denn die Infiltration von potentiell Tumor-erkennenden Immunzellen ist nicht immer assoziiert mit einer ausreichenden Anti-Tumor-Reaktion. Zum anderen sind sie teilweise schwer zu identifizieren und zu expandieren (Morgan et al., 2006; Galluzzi et al., 2012).

Abhilfe kann hier die genetische Veränderung von normalen Lymphozyten bieten, in die transgen ein TAA-spezifischer T-Zellrezeptor (TZR) transferiert wird. Hoch affine TZR können retro- oder lentiviral in autologe T-Zellen transduziert werden. Entscheidend ist hierbei, dass der Rezipient das HLA-Restriktionselement für den exogenen Rezeptor aufweist, damit die Erkennung gewährleistet ist (Johnson et al., 2009; Thomas et al., 2010). So wurde ein HLA-A2-restringierter MART-1-spezifischer Rezeptor aus TIL isoliert und in periphere Blutlymphozyten (PBL) transduziert. Diese zeigten *in vitro* eine starke Erkennung von HLA-A2⁺, MART-1⁺ Melanomzelllinien, die anhand der Zytokinsekretion (IFN- γ und GM-CSF), der zellulären Lyse von Zielzellen, sowie dem Proliferationsverhalten in Anwesenheit von IL-2 untersucht wurde (Gattinoni et al., 2006).

Der Transfer von transgenen TZR in PBL birgt gewisse Vorteile: die biophysikalischen Eigenschaften des Rezeptors, sowie die Zellsubpopulation, in die der Rezeptor transferiert werden soll, kann beeinflusst werden. Gattinoni et al. entdeckten 2011 eine langlebige humane Gedächtnis-T-Zellpopulation (Stammzell-Gedächtnis-T-Zellen, T_{SCM}), die eine höhere Proliferationskapazität aufwiesen, sowie in Mäusen eine bessere Anti-Tumorantwort vermitteln konnten. Da T-Zelldifferenzierung invers mit einer effizienten Anti-Tumorantwort korreliert ist, eignen sich T_{SCM} besser als zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) und letztere eignen sich wiederum besser als Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}) für den ATZT (Gattinoni et al., 2011; Restifo et al., 2012). Weiterhin sind CD4⁺ T-Helferzellen wichtig für die Aktivierung und das Überleben von CD8⁺ T-Effektorzellen. Daher sollten sowohl CD8⁺, als auch CD4⁺ T-Zellen für den Transfer des TZR vorgesehen werden, um eine adäquate Tumorabwehr zu erreichen (Rosenberg et al., 2004; Mortenson et al., 2013).

Des Weiteren können Gene in TZR-rezipiente Zellen eingebracht werden, die die Funktion und das Überleben der Zellen verbessern. Dazu gehören beispielsweise Gene, die kostimulatorische

Moleküle codieren, Apoptose inhibieren oder Entzündungsreaktionen induzieren, homeostatische Proliferation vermitteln und Chemokinrezeptoren oder Transkriptionsfaktoren kodieren, die die T-Zelldifferenzierung bestimmen. Beispielsweise wurden T-Zellen dahingehend manipuliert, dass sie autokrin IL-12 sezernierten, wodurch die IFN- γ -Produktion verstärkt wurde und sie schlussendlich insensitive gegenüber regulatorischen T-Zellen waren (Pegram et al., 2012; Restifo et al., 2012). Das Gen für Bcl-2 verschaffte den TZR-transduzierten Zellen einen Überlebensvorteil gegenüber den nicht-transduzierten Zellen. Damit können diese Zellen dem Zelltod entgehen und können zu einer effizienten Tumorabwehr beitragen (Charo et al., 2005).

Daneben müssen einige Hürden, wie die Möglichkeit einer Fehlpaarung zwischen endogenen und exogenen α - bzw. β -TZR-Ketten in der Rezipientenzellen, genommen werden. Dies kann zu unerwünschten Erkennungen von anderen Zielstrukturen führen, so dass Autoimmunität entstehen kann. Um dies zu vermeiden, wird der konstante Teil des TZR mit Teilsequenzen aus der Maus modifiziert oder zusätzliche Cysteinbrücken eingebracht, so dass eine Paarung der exogenen TZR-Ketten wahrscheinlicher wird. Alternativ können $\gamma\delta$ -T-Zellen als Empfängerzellen fungieren. Das Risiko der Toxizität kann ebenfalls durch Kreuzreaktivität des Rezeptors bzw. durch die Bindung an andere Antigene, die aufgrund von Mimikry erkannt werden, erhöht sein. Regulatorische T-Zellen müssen vor der Transduktion des TAA-spezifischen TZR ausgeschlossen werden, damit nicht ein immunsupprimierender Phänotyp induziert wird (Marr et al., 2012; Restifo et al., 2012).

Sicherheits-Aspekte können mit Hilfe eines Selbstmord-Gens (*suicide gene*) erhöht werden, das zusätzlich zum TZR in die Zellen transferiert wird. Für geeignet erwies sich Caspase 9, die durch Applikation eines synthetischen Medikamentes aktiviert wird, woraufhin ein schneller Tod der TZR-transgenen Zellen induziert wird (van Loenen et al., 2013). Eine geringe Expression oder Affinität der exogenen TZR sind weitere Herausforderungen, die zu berücksichtigen sind. Die Expressionseffizienz kann gesteigert werden, indem die α - und β -Kette des TZR im Vektor hintereinander geschaltet werden, getrennt durch z.B. IRES (*internal ribosomal entry site*), bzw. die Sequenzen codonoptimiert werden. Eine stärkere Bindung an das Epitop kann durch Affinitätsmaturierung erreicht werden. Dabei wird die CDR (*complementary determining region*) verändert, so dass die Spezifität möglichst erhalten bleibt, die Bindungsaffinität aber gesteigert wird (Leisegang et al., 2008; Thomas et al., 2011).

Bifunktionale T-Zellen bieten sich an, um die Anti-Tumorantwort aufrecht zu erhalten, auch wenn TAA im Tumormilieu herunterreguliert sind. Es handelt sich hierbei um T-Zellen, deren endogener TZR ein Viruspeptid erkennt und die mit einem TAA-spezifischen TZR zusätzlich transduziert werden. Virus-Antigen-präsentierende Zellen gewähren somit die Proliferation, das Überleben und die Funktion der bifunktionalen T-Zellen über den endogenen Rezeptor. Tumornekrose oder -regression vermittelnde bifunktionale Zellen konnten bis zu sechs Monaten nach Applikation reisoliert und *in vitro* weiter expandiert werden. Nachteile sind verstärkte Nebenwirkungen, wie z.B.

Ausschlag, Uveitis oder teilweise Hörverlust zusammen mit Schwindel (Johnson et al., 2009; Marr et al., 2012).

Die T-Zellantwort in Patienten kann durch eine vorangegangene Immunablation verbessert werden. Der positive Effekt beruht auf der Dezimierung regulatorischer T-Zellen durch Bestrahlung oder Chemotherapie, wodurch Tumorzellen sterben und Antigen-präsentierende Zellen TAA aufnehmen und präsentieren können. Außerdem bildet sich eine Nische für die adoptiv transferierten Zellen, sodass diese mit anderen Immunzellen weniger um Zytokine konkurrieren müssen (Gattinoni et al., 2006; Zitvogel et al., 2008; Rosenberg und Dudley, 2009).

Zu den noch offenen Fragen in der Immuntherapie gehören, welche Zielantigene sich für die Krebstherapie eignen und wie viele der Tumorzellen das Zielantigen exprimieren und ob diese Antigene Epitope für CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen aufweisen. Außerdem ist noch immer unklar, ob alle Tumorzellen anvisiert werden müssen, oder ob ein Teil ausreicht, der dann die restlichen Krebszellen mit in den Zelltod stürzt (bystander killing) (Restifo et al., 2012).

1.4 T-Zellentwicklung und Reifung zu aktivierten Effektor-T-Zellen

Im Thymus findet die T-Lymphozytenreifung und -selektion auf Selbsttoleranz statt. Die T-Lymphozyten bilden sich nicht aus im Thymus residierenden, sich selbst erneuernden Vorläuferzellen, sondern alle Lymphozytenvorläuferzellen werden ursprünglich im Knochenmark gebildet, wobei T-Lymphozyten in den Thymus einwandern. Zu den auf Vorläuferzellen befindlichen, wichtigen Chemokinrezeptoren gehören CCR7, CCR9 und der P-Selektinligand P-Selektin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL1), die die Besiedlung des Thymus mit multipotenten hematopoetischen Vorläuferzellen ermöglichen. Nicht kontinuierlich, sondern in Schüben findet das Einwandern während der Embryogenese, sowie im Erwachsenenalter statt (Takahama, 2006; Naito et al., 2011; Zlotoff et al., 2011). Der Reifungsprozess besteht aus mehreren Stufen: Die Vorläuferzellen differenzieren zu CD4⁺ CD8⁺ doppelt positiven Thymozyten, durchlaufen positive und negative Selektion und wandern schlussendlich als reife T-Zellen in peripheres Blut und Gewebe. Ausschlaggebend für eine erfolgreiche Reifung ist die Expression eines funktionalen TZR, der Peptid:Selbst-MHC erkennen kann und zur Aktivierung der T-Zelle führt. $\alpha\beta$ -T-Zellen erkennen mit ihren Rezeptoren Peptide auf MHC-I oder -II Molekülen bzw. Lipidantigene auf CD1 Molekülen (Takahama, 2006; Krangel, 2009). Die vom TZR erkannten Liganden der meisten $\gamma\delta$ -T-Zellen hingegen sind noch immer unbekannt, wobei Mausexperimente daraufhin deuten, dass nicht klassische MHC-Ib Moleküle als Bindepartner fungieren können (Shin et al., 2005). Über ihre Funktion ist ebenfalls kaum etwas bekannt, außer dass sie als wichtige Quelle für IFN- γ dienen (Dunn et al., 2006).

Sowohl die α - als auch die β -Kette besteht aus einer variablen (V)-Region, einer *joining* (J)-Region, sowie einer konstanten (C)-Region. Zwischen der V- und J-Region der β -Kette befindet sich zusätzlich eine *diversity* (D)-Region. Somit setzen sich die TZR-Ketten aus verschiedenen Gensegmenten zusammen. Die hypervariablen Schleifen CDR3 α und CDR3 β des TZR, die die Verknüpfungsbereiche der Gensegmente darstellen, sind für die Erkennung des Peptides, welches sich in der Bindungsgrube des MHC-Moleküles befindet, verantwortlich. CDR1 α und CDR1 β tragen gelegentlich ebenfalls zur Peptiderkennung durch die Bindung an das amino- und carboxy-terminale Peptidende bei, interagiert aber größtenteils, genauso wie die CDR2 Schleife, mit dem MHC-Molekül (Wucherpfennig et al., 2010).

Der TZR der T-Zellen muss gewisse Eigenschaften, wie die Bindung mit geringer Affinität an Peptid:Selbst-MHC Moleküle, erfüllen. Nur 1-5% der CD4⁺ CD8⁺ doppelt-positiven T-Zellen erfüllen dieses Kriterium und werden „positiv selektiert“. Sie erhalten ein Überlebenssignal, weisen viele TZR auf der Zelloberfläche auf und differenzieren zu einfach positiven CD4⁺ CD8⁻ oder CD4⁻ CD8⁺ T-Zellen. Zellen mit TZR, die eine hohe oder keine Affinität zu Peptid:Selbst-MHC-Moleküle zeigen, werden deletiert. Positiv selektierte Zellen wandern in die Medulla, wo sie die negative Selektion durchlaufen müssen, um zellulär-vermittelte Zytotoxizität zu verhindern. Hierfür präsentieren medullare Epithelzellen und Dendritische Zellen Gewebe-spezifische Selbst-Antigene. Selbst-reaktive T-Zellen mit hoher Avidität gegen Selbst-Antigene werden eliminiert, oder entwickeln sich zu regulatorischen T-Zellen. Somit verbleiben nur CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen, die nicht Selbst-Peptide aber Fremd-Peptide auf Selbst-MHC-Molekülen mit hoher Avidität erkennen können (Anderson und Takahama, 2012).

Die spezifische Aktivierung der T-Zellen wird von reifen DZ vermittelt, die in der Peripherie Antigene aufnehmen und prozessieren, in den Lymphknoten wandern und auf ihrer Oberfläche auf MHC-I oder -II Molekülen den CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen präsentieren. Endozytotisch aufgenommene Antigene werden in Endosomen proteolytisch in Peptide zerlegt. Fusionieren Golgi-Vesikel, die MHC-II-Moleküle aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) beherbergen, mit den Endosomen, bilden sich sog. MHC-II-Kompartimente (MIIC). Dort wird die invariante Kette auf dem MHC-II, die die Stabilität des Komplexes gewährleistet und die Bindung von selbst-Peptiden verhindert, degradiert und durch das exogen aufgenommene Peptid ersetzt. Der Peptid:MHC-II-Komplex wird schließlich an die Zelloberfläche transportiert und CD4⁺ T-Helferzellen präsentiert. Für die Präsentation auf MHC-I werden endogene Proteine im Zytoplasma durch Proteasomen in Peptide gespalten, über Transporterproteine (TAP, transporter associated with antigen processing) in das ER gebracht und dort auf MHC-I Moleküle geladen, wodurch sich ein stabiler Komplex bildet. Dieser wird mittels Vesikeln des Golgi-Apparates zur Zelloberfläche transportiert und führt zur Aktivierung Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen (Boudreau et al., 2011).

Nahezu alle Körperzellen tragen MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche, um entweder dem Immunsystem signalisieren zu können, dass alles in Ordnung ist und die Zelle nicht getötet wird,

oder um anzuzeigen, dass etwas vom normalen Status abweicht, sei es durch Mutationen, wie es bei Krebs der Fall sein kann, oder durch Infektion mit einem Erreger (Apcher et al., 2012). Über sog. Kreuzpräsentation können auch exogene Antigene auf MHC-I-Molekülen präsentiert und eine zytotoxische CD8⁺ T-Zellantwort induziert werden (Dresch et al., 2012; Hopkins und Connolly, 2012).

Andererseits wurde erst vor Kurzem gezeigt, dass mit Hilfe der Signalsequenzen von Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1 (LAMP-1) und DC-LAMP endogene Proteine auf MHC-II präsentiert werden können und somit eine CD4⁺ T-Zellantwort induziert wird. Die Signalsequenz des murinen LAMP-1 wurde an das aminoterminal Ende der Zielproteine fusioniert, wodurch die Translokation zum endoplasmatischen Retikulum gewährleistet wurde. DC-LAMP-Sortierungs-Signalsequenzen wurde an das carboxyterminale Proteinende fusioniert, um die Translokation in das Kompartiment zu ermöglichen, in dem HLA-Klasse II prozessiert wird. Somit sorgten die beiden Sortierungssignale dafür, dass die assoziierten Proteine in das MHC transportiert wurden und schlussendlich auf MHC-II geladen wurden. DZ, die mit Signalsequenzen-modifizierten TAA-RNS beladen wurden, konnten die Präsentation von Tumor-assoziierten-Peptiden auf MHC-I und -II vermitteln (Van Nuffel et al., 2012b).

Das Aktivierungssignal über den TZR ist nur eines von dreien, das die T-Zellen für die Aktivierung benötigen. Das zweite Signal erhalten die T-Zellen über kostimulatorische Moleküle, deren Liganden sich auf den DZ befinden. So verbessert die Interaktion des CD27 oder CD28 auf T-Zellen mit CD70 bzw. CD80 auf DZ die Expansion, das Überleben und die Zytotoxizität von Antigen-spezifischen T-Zellen (Larosa und Orange, 2008; Van Brussel et al., 2012). CD137 (4-1BB) ist ein Aktivierungs-induzierendes T-Zell-kostimulatorisches Molekül, das zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehört. Es wird u.a. von spezifisch aktivierten T-Zellen exprimiert, wobei seine Bindung an den Liganden auf z.B. DZ zur Hochregulierung von überlebenswichtigen Genen führt, die die Zellteilung verstärkt, die Zytokinproduktion induziert und die Aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation-induced cell death*) verhindern kann. Daher kommen gegen CD137-gerichtete monoklonale Antikörper bereits in der Tumorthherapie zum Einsatz (Wolfl et al., 2008; Vinay und Kwon, 2012).

Als drittes Signal benötigen T-Zellen Zytokine, die entweder von den DZ kommen, oder durch die T-Zellen selbst synthetisiert werden. DZ sekretieren u.a. IL12p70, das T-Zellen dazu anregt, IFN- γ zu produzieren und die Generierung von zytotoxischen T-Lymphozyten bevorzugt. T-Zellen sind ebenfalls angewiesen auf autokrines IL-2, da andernfalls Anergie induziert wird. Es konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Helferzellen essentiell für die Expansion von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen sind, indem sie wichtige Zytokine wie IL-2 und IL-21 zur Verfügung stellen und die IL-21-Rezeptorexpression in CD8⁺ T-Zellen erhöht, so dass der Effekt von IL-21 verstärkt wird (Larosa und Orange, 2008; Butler et al., 2012; Van Brussel et al., 2012). (Abb. 1)

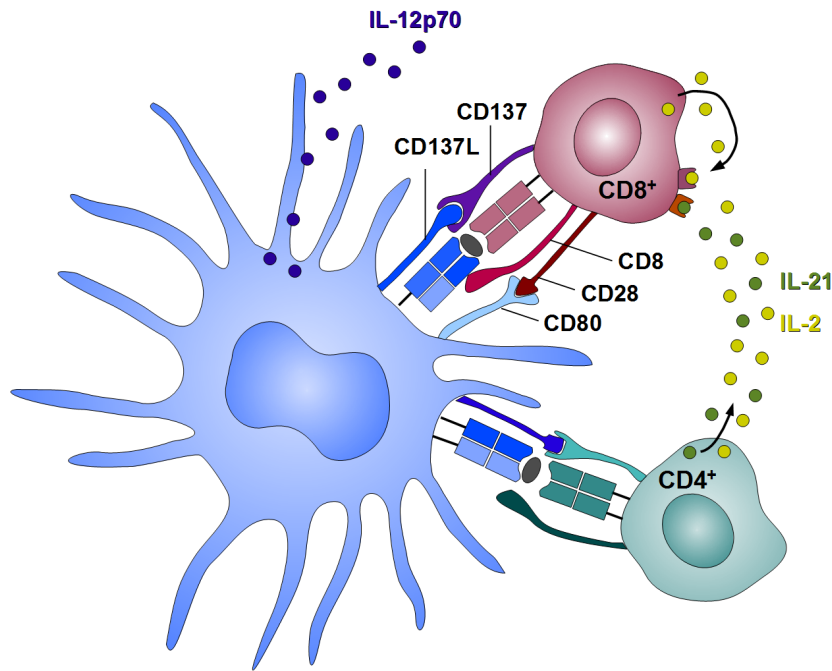


Abbildung 1: Zell- und Zytokin-vermittelte Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen

Für die erfolgreiche Aktivierung und Expansion von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bedarf es dreier unterschiedlicher Signale. Erkennen CD8⁺ T-Zellen ein von DZ-präsentiertes Antigen, so erhalten sie über den TZR ein Aktivierungssignal (Signal 1). Dies wiederum führt zur Expression von kostimulatorischen Molekülen auf der T-Zelloberfläche (z.B. CD28 und CD137), die ihren Liganden auf der DZ finden (CD80 und CD137L) (Signal 2). Nicht zuletzt benötigen die CD8⁺ T-Zellen für ihre Expansion und ihr Überleben wichtige Zytokine, die sie entweder selbst synthetisieren (autokrines IL-2) oder von DZ (IL12p70) bzw. CD4⁺ T-Zellen erhalten (IL-21 und IL-2).

Aktivierte CD8⁺ T-Zellen können entweder zu langlebigen zentralen Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM} , central memory) oder zu kurzlebigen Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM} , effector memory) differenzieren. T_{CM} persistieren als Antigen-spezifische Vorläuferzellen und können unabhängig von ihrem Antigen für lange Zeit in Homöostase verbringen. Sie exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7 und residieren vornehmlich in lymphoidem Gewebe. Treffen sie auf ihr Antigen, werden sie reaktiviert, teilen sich sehr schnell und differenzieren zu Effektor-T-Zellen. Im Gegensatz dazu befinden sich T_{EM} im peripheren Gewebe und haben eine sehr eingeschränkte Proliferationskapazität. Wie der Name schon verrät, heben sie sich mit ihrer Eigenschaft als Effektor-T-Zellen hervor. Die Entscheidung, ob eine T-Zelle zu T_{CM} oder T_{EM} differenziert, hängt von verschiedenen Faktoren ab. So spielt die Stärke des TZR-Signals, sowie das Zytokinmilieu eine wichtige Rolle. Beispielsweise nimmt das Überleben und die Proliferationsfähigkeit von CD8⁺ T-Zellen, die wiederholt mit ihrem spezifischen Antigen und IL-2 stimuliert wurden, stark ab. IL-15 und IL-7 unterstützen die Differenzierung und den Erhalt von T_{CM} . Zusammenfassend stellen T_{EM} die Überwachungspatrouille in der Peripherie dar, die schnell agieren können, wohingegen T_{CM} als Reserve einspringen (Larosa und Orange, 2008).

Treffen zytotoxische T-Zellen auf Zellen, deren Antigen durch den TZR erkannt werden können,

führt dies zum Zelltod der Zielzelle. Erreicht wird dies durch die gezielte Ausschüttung von Perforin und Granzymen, die in das Zytoplasma der Zielzelle eindringen und Apoptose induzieren. Alternativ können Effektor-T-Zellen den Zelltod durch Interaktion des CD95-Liganden mit dem dazu passenden Rezeptor CD95, der auf der Zielzelle zu finden ist, auslösen. Durch die simultane Sekretion von IFN- γ und IL-2 werden MHC-Moleküle hochreguliert und weitere Immunzellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und NK-Zellen rekrutiert und aktiviert. Auf diese Weise werden schädliche Zellen, wie Krebszellen oder infizierte Körperzellen beseitigt (Dunn et al., 2006; Biswas und Mantovani, 2010; Law et al., 2010; Martini et al., 2010).

1.5 Tumor-Testis-Antigene (TTA oder CTA, *cancer testis antigens*)

Auf der Suche nach geeigneten Tumorantigenen, die in der Krebstherapie als Target fungieren können, wurde in den 1970ern von Lloyd J. Old die sog. „autologe Typisierung“ entwickelt. Dabei fungierten Zellen aus Tumor- und Normalgewebe eines Krebspatienten als Zielzellen für Autoantikörper bzw. autologe T-Zellen, die spezifisch für Tumor-assoziierte Antigene waren. Auf diese Weise wurde das virale Tumorantigen p53 identifiziert. Boon entdeckte das erste TTA MAGE-1 unter Verwendung einer Cosmid-Bibliothek, die mit DNS-Fragmenten der Melanomzelllinie MZ2-E bestückt wurde und zur spezifischen Erkennung von MAGE-1 durch zytotoxische T-Zellen führte. Mitte der 1990er entwickelten Michael Pfreundschuh, Ugur Sahin und Ozlem Türeci diese Methode zur sog. SEREX-Methode (*serological identification of antigens by recombinant expression*) weiter. cDNS aus Tumorzellen wird hierbei über Bakteriophagen in Bakterien eingebracht und exprimiert. Die so hergestellten Proteine werden auf Membranen übertragen und mit Antikörpern von Krebspatienten inkubiert. Nach Ausschluss der Antikörper, die Virus- oder Bakterien-spezifisch bzw. spezifisch gegen IgG komplementäre DNS von B-Zellen sind, werden autoreaktive Antikörper aussortiert. Die verbliebenen Antikörper zeigen eine spezifische Bindung gegen Antigene aus Tumorgeweben. Anhand dieser Technologie können neue Tumorantigene identifiziert werden. Wird ein potentiell Tumor-assoziiertes Antigen entdeckt, werden ergänzend zu SEREX weitere Untersuchungen auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt, um die Tumorspezifische Expression des Antigens zu verifizieren (Chen, 2004; Jager und Knuth, 2012).

Die Bezeichnung „Tumor-Testis-Antigene“ wurde erstmals von Chen et al. 1997 eingeführt, als diese mit Hilfe der SEREX-Methode und RT-PCR das Tumor-assoziierte Antigen NY-ESO-1 in verschiedenen Tumoren als auch in Testis- sowie im Ovarialgewebe nachwiesen (Cheng et al., 2011). Aufgrund ihrer starken Immunogenität und der restringierten Expression in vielen verschiedenen Tumoren und immunprivilegiertem Gewebe, eignen sich TTA als Kandidaten für die immunbasierte Krebstherapie. Da das Testisgewebe keine MHC-I oder MHC-II Moleküle aufweist und die

Blut-Testis-Barriere den Zugang für das Immunsystem verhindert, sollte keine Toleranz gegenüber Testisantigenen ausgelöst werden und für immuntherapeutische Zwecke sind keine unerwünschten Nebeneffekte oder sog. „*Off-target*“-Effekte gegen Normalgewebe zu erwarten (Lim et al., 2012; Suri et al., 2012).

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen TTA, deren Gene auf dem X-Chromosom (TT-X) oder auf somatischen Chromosomen (nicht-X TTA) lokalisiert sind. TT-X sind vermehrt in Spermato gonien exprimiert, wohingegen nicht-X TTA in der späteren Phase der Keimzellendifferenzierung, wie den Spermatozyten, vorkommen und für die Meiose wichtig sind. Ihre entartete Expression in Krebszellen führt vermutlich zur abnormalen Chromosomensegregation und Aneuploidie (Cheng et al., 2011; Lim et al., 2012; Nishikawa et al., 2012).

Mit Ausnahme einiger weniger immunhistochemischen Studien, gibt es keine Untersuchungen zur Funktionsweise der mittlerweile über 100 bekannten TTA. Es wird aufgrund der beobachteten Expressionsmuster und auf Grundlage einiger Studien eine Rolle in der Spermiogenese, der Keimzellapoptose, dem Zellüberleben, der Zellzyklusregulation und dem Zellzyklusablauf oder der transkriptionellen Regulation angenommen (Cheng et al., 2011; Nishikawa et al., 2012).

1.6 Ausgewählte Tumor-Testis-Antigene

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Tumor-Testis-Antigene ausgewählt, gegen die in vitro eine zelluläre Immunantwort generiert werden soll: GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX4 und XAGE-1. cTAGE-1 wurde hinsichtlich seines Expressionsmusters in verschiedenen Zelllinien in dieser Arbeit untersucht. Es ist auf einem somatischen Chromosom lokalisiert und zählt damit zu den nicht-X TTA, während GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX4 und XAGE-1 auf dem X-Chromosom lokalisiert sind (TT-X). Allen gemeinsam ist das weit verbreitete Vorkommen in Tumoren.

Unter den aufgeführten Antigenen ist cTAGE-1 mit 74 Aminosäuren das kleinste Protein. Es wurde mit der SEREX-Methode entdeckt und seine mRNS wurde in 35% der kutanen T-Zelllymphoma (*cutaneous T-cell lymphoma*, CTCL) nachgewiesen. Seine Funktion ist bislang unbekannt (Eichmüller et al., 2001; Chen, 2004).

GAGE-1 wurde über eine autologe ZTL-Antwort entdeckt. Verschiedene Gruppen haben es in unterschiedlichen Tumoren wie Melanom, Lungen-, Schilddrüsen, Brust- Leber- und Ovarialkrebs identifiziert. Transkripte des Gens wurden ebenfalls in Primaten gefunden, was darauf schließen lässt, dass das Gen im Laufe der Evolution unter positiver Selektion stand. XAGE-1 zeigt eine starke Homologie zu GAGE-1, da sie zu 65% in ihrer mRNS-Sequenz identisch sind, wobei die Proteinstruktur voneinander abweicht und auf unterschiedliche Funktionen hinweist (Gjerstorff und Ditzel, 2008). Die dominante Form in Testis und Tumoren ist XAGE-1b. Ein Kernlokalisationssignal

(NLS, nuclear localization sequence) weist darauf hin, dass das Protein eine Funktion innerhalb des Zellkerns ausübt. XAGE-1 konnte in Ewing-Sarkom, Lungen-, Brust- und Prostatakrebs nachgewiesen werden (Zendman et al., 2002a; Zendman et al., 2002b; Chen, 2004; Sato et al., 2007; Gjerstorff und Ditzel, 2008; Zhao et al., 2011).

MAGE-A4 kommt in verschiedensten Tumorarten, wie in Lungenkarzinomen (51%), Oesophaguskarzinomen (63%), Melanomen, Ovarialkarzinomen und ATLL-Patienten vor. Daher eignet sich dieses Antigen für die Immuntherapie. In Krebspatienten konnte bereits eine humorale und zelluläre Immunantwort gegen Mitglieder der MAGE-Familie nachgewiesen werden. Mehr als 60 Gene gehören zur MAGE-Familie, die alle eine konservierte Sequenz von 200 Aminosäuren, die sogenannte MAGE-Homologiedomäne (MHD) aufweisen. Die starke Expression der MAGE-Gene in frühen Spermatozyten lässt auf eine Beteiligung im Zellzyklusverlauf, genauer der Vorbereitung von Keimzellen auf die Meiose I und II, schließen. MAGE-ähnliche Gene sind auch in *Drosophila melanogaster*, im Zebrafisch, *Saccharomyces* und sogar in *Arabidopsis thaliana* zu finden, was auf eine evolutionär konservierte Funktion schließen lässt (De Plaen et al., 1994; Gjerstorff und Ditzel, 2008; Cheng et al., 2011; Nishikawa et al., 2012).

NY-ESO-1 ist das am besten untersuchte und das bis dato immunogenste TTA. Sowohl eine humorale als auch zelluläre Immunantwort wurde gezeigt. Exprimiert wird NY-ESO-1 von Melanomen, Brust-, Prostata-, Speiseröhren-, und Ovarialkarzinomen. In Patienten mit adulter T-Zellleukämie/Lymphom (*adult T-cell leukemia/lymphoma*, ATLL) wurde in 11,6% der Fälle eine humorale Antwort und in 55,6% eine zelluläre Antwort (CD8⁺ T-Lymphozyten) beobachtet. Verschiedene klinische Phase I bis III Studien, basierend auf immuntherapeutischen Ansätzen, werden zur Zeit durchgeführt (Valmori et al., 2000; Sadanaga et al., 2001; Yamaguchi et al., 2004; Cheng et al., 2011).

SSX4 (synovial sarcoma x) ist eines von insgesamt neun Genen aus der Multigenfamilie. SSX4 ist im Nukleus der Spermatogonia und frühen Spermatozyten vorzufinden, nicht aber in pachytenen Spermatozyten und Spermatozoa, das auf eine Rolle in der Zellproliferation und -zyklus schließen lässt. Die Translokation von Chromosom X auf Chromosom 18 führt zu dem Fusionsprotein SS18-SSX. Das SS18-Gen, das auf Chromosom 18 lokalisiert ist, ist ein transkriptioneller Aktivator, wohingegen SSX als Repressor fungieren. Das Zielprotein des Fusionsproteins ist COM1, ein Regulator der Zellproliferation. Es wird durch SS18-SSX in Weichteilkarzinoma herunterreguliert (Cheng et al., 2011).

Alle hier ausgewählten TTA sind in der Literatur als restringiert auf immunprivilegiertem Gewebe oder Tumorgewebe beschrieben. Daher wird ihr Potenzial als Antigene für eine immuntherapeutische Krebstherapie als sehr hoch eingestuft, weshalb sie auch für diese Doktorarbeit ausgewählt wurden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Der adoptive T-Zelltransfer bietet eine effiziente Tumortherapiemöglichkeit, wenn T-Zellen mit hoch-affinen T-Zellrezeptoren (TZR) ausgestattet werden, um möglichst alle Tumorzellen zu eliminieren und Tumorflecht zu verhindern. Für die Generierung dieser hoch-affinen TZR ist es wichtig, die Tumorantigene, die meist Selbst-Antigene darstellen, in einen fremden MHC-Kontext zu stellen. Denn T-Zellen, die Selbst-Antigen:Selbst-MHC mit hoher Affinität erkennen können, werden bereits im Thymus negativ selektiert und aus dem T-Zellrepertoire herausgefiltert. Der in unserer Arbeitsgruppe von S. Wilde etablierte semi-allogene Induktionsansatz berücksichtigt dieses Dilemma, indem dendritische Zellen (DZ) parallel mit dem Zielantigen und einem fremden MHC-I-Allel beladen werden, wodurch allo-reaktive, Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden können (Wilde et al., 2009).

Ein Ziel dieser Doktorarbeit war die Erweiterung des semi-allogenen Ansatzes, indem Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen durch Präsentation von mehreren Tumorantigenen auf verschiedenen allogenen MHC-I-Molekülen induziert werden können. Dazu sollten mehrere verschiedene Tumor-Testis-Antigene (TTA) in Form von in vitro transkribierter(ivt)-mRNS in DZ transfiziert werden, die aufgrund ihres genetischen Hintergrundes im Vergleich zu den T-Zellen die Antigene auf mehreren allogenen MHC-I-Allelen präsentieren (multi-allogener Ansatz).

Die Wahl der einzusetzenden Zielantigene sollte sich auf das Ergebnis des Expressionsprofils sechs verschiedener TTA (cTAGE-1, GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX4 und XAGE-1) in verschiedenen Zelltypen stützen. Dadurch sollte auf lange Sicht gesehen verhindert werden, dass der Einsatz von TTA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen als Therapeutikum die Zerstörung von nicht-tumorigen Gewebe zur Folge hat. Daher war es essentiell, dass die zu untersuchenden Antigene nicht von normalen Zellen exprimiert wurden.

In der Literatur wird verstärkt die für die Induktion von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wichtige CD4⁺ T-Zellhilfe beschrieben. Aus diesem Grund sollten die Zielantigene an die beiden Signalsequenzen von DC-LAMP und LAMP-1 gekoppelt (CrossTA_g) werden, um dadurch die Präsentation der Antigene nicht nur auf MHC-I, sondern auch auf MHC-II zu ermöglichen. Die Isolierung und Klonierung der TTA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sollte durchflusszytometrisch (FACS) anhand des Aktivierungs-induzierten Oberflächenmarkers CD137 (4-1BB) bewerkstelligt werden. Zur Überprüfung der Antigen-spezifität sollten TTA-ivt-mRNS-transfizierte DZ oder EBV-immortalisierte B-Zellen (Mini-LCL) eingesetzt werden. Für die von den originalen CD8⁺ T-Zellklonen unabhängige T-Zellrezeptor(TZR)-Analyse stand eine neuartige TZR-Vektorbibliothek für die Rekonstruktion von TZR zur Verfügung, anhand derer TZR in alternative Effektor-Rezipienten-T-Zellen transferiert werden können.

Außerdem sollte im NOD/scid IL2R^γnull (NSG)-Mausmodell die effiziente Induktion von CD8⁺ T-Zellen in Abhängigkeit der CrossTA_g-Signalsequenzen untersucht werden. NSG-Mäuse sind

defizient in T-, B- und NK-Zellen, wodurch sie sich besonders für eine Rekonstitution mit humanen Immunzellen eignen (Shultz et al., 1995). Dazu sollten humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) in vier Gruppen zu je vier Mäusen injiziert werden. Eine zweimalige Vakzinierung mit DZ, die mit Melan-A- oder CrossTA_g-Melan-A-ivt-mRNS transfiziert werden sollten, sollte Aufschluss über eine verbesserte Induktionseffizienz von Antigen-beladenen DZ durch Verwendung der CrossTA_g-Sequenzen geben. Als Negativkontrolle sollte eine Gruppe fungieren, die nur mit PBMZ rekonstituiert wurde und keine Vakzinierung erhielt. Eine weitere Gruppe erhielt DZ, die sich 1:1 aus DZ zusammensetzte, die mit CrossTA_g-gekoppelter oder Melan-A-ivt-mRNS ohne Signalsequenzen transfiziert wurden.

2 MATERIAL

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tab. 2.1: Geräte

Produkt	Firma, Firmensitz
Bestrahlungsanlage ^{137}Cs , HWM-D-2000	Gammacell, Ottawa (Kanada)
Brutschrank, CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus, München
Cell Quest, FACS™ Software	BD, Heidelberg
Eismaschine	Scottsman, Mailand (Italien)
Elektroporator Gene Pulser Xcell™	Bio-Rad, München
Elisa-Reader Sunrise	Tecan, Crailsheim
ImmunoCompliance™ (ELISpot-Reader)	C.T.L., Bonn
Durchflusszytometer Calibur	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer, LSR II	BD, Heidelberg
Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Gelapparatur DNA Sub Cell	Bio-Rad, München
Gelapparatur Geltray	Renner, Dannstadt
Gelprint 2000i	Biophotonics, Ann Arbor (USA)
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Intelli Mixer RM-2	LTF Labortechnik, Wasserburg/Bodensee
Kühlzentrifuge 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Kühlzentrifuge Eppendorf Centrifuge 54172	Eppendorf, Hamburg
Laborwaagen B6, P120, PC 440	Mettler, Giessen
Lichtmikroskop, Auflicht	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop, Durchlicht	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer IKA RCT	Bachofen, Reutlingen
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikrowellengerät FM 3510	Moulinex, Frankreich
Milli-Q®, Reinstwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
Nalgene „Mr Frosty“ Freezing Container	Thermo-Scientific, Massachusetts (USA)
NanoDrop ND-1000	PEQLAB, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	neo-Lab, München
PCR-Master Cycler	Eppendorf, Hamburg
PCR-Thermocycler T-1	Biometra®, Göttingen
pH-Meter pH391	WTW, Weilheim
Pipetten Eppendorf/Gilson	Materiallager, Neuherberg

Produkt	Firma, Firmensitz
Pipettierhilfe, Pipetus Akku	Hirschmann, Ebersberg
Plattenzentrifuge Labofuge 6000	Heraeus, München
Schüttler MTS4	IKA, Staufen
Schüttler TR 125	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Schüttler Vortex Genie 2	Bachofen, Reutlingen
Spektralphotometer, Utraspec® 1100 pro	Amersham Biosciences, Amersham (UK)
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim, Krefeld
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, München
Tischzentrifuge Hettich Mikroliter	Bachofen, Reutlingen
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge Sorvall® RC-5B	Thermo-Scientific, Massachusetts (USA)
UV-Transluminator, 302 nm / 365 nm	Synoptics Cambridge (UK)
UV-Transluminator, 366 nm	Bachofen, Reutlingen
Wasserbad	Memmert, Schwabbach
Zellsortierer, FACS® Aria III	BD, Heidelberg
Zentrifuge Eppendorf Minispin	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge IEC 6000B	ICE, Bedfordshire (UK)
Zentrifuge Megafuge2.0	Heraeus, München
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich Lab Technology, Ebersberg

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterial

Produkt	Firma, Firmensitz
1,5 ml -Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten, 5/10/25 ml	Greiner, München
Einmalspritzen, 1/10/50 ml	BD, Heidelberg
Eismaschine	Scottsman, Mailand (Italien)
Elektroporationsküvetten, 01/0,4 cm	Bio-Rad, München
FACS™ Röhrchen	Peske OHG, Aindling
Falcon-Röhrchen, 15/50 ml	BD, Heidelberg
Filterpapier	Materiallager, Neuherberg
Filtereinheit, fast flow & low binding, 45 µm	Millipore, Schwalbach
Filtereinheit, 22 µm	Millipore, Schwalbach
Kryo-Röhrchen, 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Kulturplatten, 24-/48-Loch, Flachboden	BD, Heidelberg

Produkt	Firma, Firmensitz
Kulturplatten, 6-/96-Loch, Flachboden	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Kulturblock, 96-Tiefloch	Nunc, Wiesbaden
Kulturplatten, 96-Loch, Rundboden	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Penzberg
Nitrilhandschuhe	Semperit, Wien (Österreich)
Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 Well	Nunc, Wiesbaden
Pasteurpipetten	Peske OHG, München
PE Folie, selbstklebend	Macherey-Nagel, Düren
Petrischalen (Falcon)	BD, Heidelberg
Pipettenspitzen Eppendorf/Greiner	Materiallager, Neuherberg
Pipettenspitzen, gestopft	Starlab, Ahrensberg
Zellsieb, 40 µm Nylon	BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 175 cm ²)	BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Greiner, München
Zellkulturflaschen (Nunclon™ 25 cm ² und 80cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen, 30 x 10 mm, steril	BD, Heidelberg
Zellkulturschalen 94 x 16 mm, steril	Greiner, München

2.2 Enzyme, Zytokine und sonstige Reagenzien

Tab. 2.3: Restriktionsenzyme

Produkt	Firma, Firmensitz
<i>BstEII</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>DraIII-HF</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>EcoRI</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>FspI</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>HindIII</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>SpeI</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main

Tab. 2.4: Zytokine und TLR-Liganden

Produkt	Firma, Firmensitz
GM-CSF, human	Berlex, Seattle (USA)
Interferon- γ (IFN- γ), human	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Interleukin-1 β (IL-1 β), human	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-2 (IL-2), human	Chiron Behring, Marburg
Interleukin-4 (IL-4), human	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-6 (IL-6), human	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-7 (IL-7), human	Rockland, Pennsylvania (USA)
Interleukin-15 (IL-15), human	PeproTech, Hamburg
Poly(I:C) (Hiltonol)	InvivoGen, San Diego
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
R848	InvivoGen, San Diego
Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), human	R&D Systems, Wiesbaden

Tab. 2.5: Enzyme und sonstige Reagenzien

Produkt	Firma, Firmensitz
1kb-plus DNS-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp DNS-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
Agar, SELECT Agar®	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose, Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
AIM V Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Bi-distilliertes H ₂ O	neo-Lab, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
CFSE (Vybrant CFDA SE Cell Tracer)	Invitrogen, Karlsruhe
CIP, Alkalische Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma, Deisenhofen
DEPC (Diethyl-Pyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNS-Autragspuffer (6x)	Invitrogen, Karlsruhe
DNS-Oligonukleotide	Sigma-Aldrich, St- Louis (USA)
EDTA [0,5 M]	Applied Biosystems, Darmstadt
Einfriermedium, ibidi Freezing Medium	Ibidi, Planegg/Martinsried
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt

Produkt	Firma, Firmensitz
Ethidiumbromid, 10mg/ml	Merck, Darmstadt
FACS™ Flow und Rinse	BD, Heidelberg
FKS (Fötale Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll®	Biochrom, Berlin
Fungizone® Antimycotic (Amphotericin B)	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glukose	Braun, Melsungen
Glycerin, 87%	Merck, Darmstadt
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium	Braun, Melsungen
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
HS (Humanserum)	IMI, München
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
LB Broth Base (Miller's LB Broth Base)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Frema, München
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
MEM (1x), Non Essential Amino Acids (NEAA)	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
MRA, Mycoplasma Removal Agent	MP Biomedicals, Illkrich (Frankreich)
Natriumazetat [3 M] (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Applied Biosystems, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
OptEIA™ TMB Substrate	BD, Heidelberg
PBS (very low endotoxin, VLE)	Biochrome AG, Berlin
PCR Master Mix	Promega, Mannheim
1-Brom-3-Chloropropan	Merck, Darmstadt
PFA, Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PHA, Purified Phytohaemagglutinin	Remel, Dartford (UK)
PI, Propidiumjodid	ICN, Eschwege
Polyethylenimin (PEI)	Sigma Aldrich, Taufkirchen

Produkt	Firma, Firmensitz
Protaminsulfat	Merck, Darmstadt
Retronektin	TATKARA, Saint-Germain-en-Laye/Frankreich
RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Thermo-Scientific, Massachusetts (USA)
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI (very low endotoxin, VLE)	Biochrome AG, Berlin
S.O.C.-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Ligase	New England BioLabs, Frankfurt/Main
T4-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt/Main
TAE (Tris Acetat EDTA) Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Tetracyclin	Merck, Darmstadt
TRI-Reagent®	Molecular Research Center, Cincinnati (USA)
Tris, Hydroxylmethyl-Aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA (0,05%; 1x)	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt
Tween 20	ICN, Eschwege
Urea	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.3 Kommerzielle Analysesysteme

Tab. 2.6: Kommerzielle Analysesysteme

Produkt	Firma, Firmensitz
BD® CompBeads Anti-Mouse Ig, κ Set	BD Bioscience, Heidelberg
„CD8 ⁺ T cell Isolation Kit II (human)“	Miltenyi, Bergisch Gladbach
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostics, Mannheim
FoxP3 Staining kit	BD Bioscience, Heidelberg
JETstar Plasmid Purification Maxi Kit	Genomed, Löhne
Human IFN-γ ELISpot PRO Kit (ALP)	Mabtech, Nacka Strand (Schweden)
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics, Penzberg
mMESSAGE mMACHINE™ T7 Kit	Ambion, Corston (UK)
OptEIA™ Human IFN-γ ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
OptEIA™ Human IL-2 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
PCR-Mastermix	Promega, Madison (USA)
Poly(A) Tailing Kit	Ambion, Corston (UK)
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Produkt	Firma, Firmensitz
BD® CompBeads Anti-Mouse Ig, κ Set	BD Bioscience, Heidelberg
QIAquick® Reaction Cleanup Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden

2.4 Kulturmedien

Tab. 2.7: Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Konzentration
293T-Zell-Medium	D-MEM	
	FKS	10 %
	L-Glutamin	2 mM
	Natriumpyruvat	1 mM
DZ-Medium	VLE RPMI 1640	
	Humanserum	1,5 %
LB-Medium	H ₂ O dest.	
	LB Broth Base (Miller's)	25 g/l
LB-Agar-Medium	LB-Medium	
	Agar	15 g/l
LCL-Medium	RPMI 1640	
	FKS	10 %
	MEM Nichtessentielle Aminosäuren	1x
	L-Glutamin	2 mM
	Natriumpyruvat	1 mM
	Gentamycin	70 µg/ml
SOB-Medium	H ₂ O dest.	
	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
SOC-Medium	SOB-Medium	
	Glucose, steril gefiltert	2 g/l
T-Zell-Medium	AIM-V	
	Humanserum	10 %
	HEPES (1 M)	10 mM
	L-Glutamin (200 mM)	2 mM
	Natriumpyruvat (100 mM)	1 mM
	Gentamycin	70 µg/ml
Waschmedium	RPMI 1640	

2.5 Puffer und Lösungen

Tab. 2.8: Puffer und Lösungen

Medium	Zusammensetzung	Konzentration
1% Milchpulverlösung (ELISA)	PBS Milchpulver	1 %
2 % BSA-Lösung	BSA Pulver PBS	2 %
DEPC- H₂O	H ₂ O dest. DEPC	0,1 %
ELISA-Beschichtungspuffer (pH 9,5)	H ₂ O dest. NaHCO ₃ Na ₂ CO ₃	8,4 g/l 3,56 g/l
ELISA-Waschpuffer	PBS Tween20	0,05 %
Elutions-Puffer (pH 5)	H ₂ O dest. Imidazol	0,5 M
FACS-Puffer	PBS FKS (Fötales Kälberserum)	1 %
TAE (10x) (pH 8)	H ₂ O dest. Tris Base NaCl	30 g/l 111 g/l
Waschpuffer für MACS-Kits	FKS Na-EDTA in PBS nach Miltenyi, Bergisch Gladbach	10% 2 mM

2.6 Zelllinien und Bakterien

Tab. 2.9: Verwendete Zellen

Name	Charakteristika	Quelle	Referenz
11/33 ZTL	Klonale ZTL-Linie; HLA-A*0201-restringiert; spezifisch für das Melan-A ₂₆₋₃₅ -Epitop, Suspensionszellen	Wölfel, T.	Wolfel et al., 1993
293T-Zellen	Embryonale Nierenzelllinie, Transfomiert durch Teile des Humanen-Adenovirus-5-Genoms, exprimieren SV40 large T-Antigen	Invitrogen	Graham et al., 1977
DZ¹	aus Monozyten von gesunden Spendern differenziert, Suspensionszellen	C. Wehner	
IVS-B ZTL	HLA-A*0201-restringiert; spezifisch für das Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇ -Epitop, Suspensionszellen	Wölfel, T.	Wolfel et al., 1993

JB4 ZTL	Klonale ZTL-Linie; Allo-HLA-A2-reaktiv, Suspensionszellen	B. Mosetter	Milani et al., 2005
Jurkat(76)-tgTZR-Melan-A	Jurkat(76)-Zellen (von M. Heemskerk) wurden stabil transduziert mit pMP71-TZR $\alpha\beta$ -Melan-A (von S.Wilde, D. Sommermeyer), Melan-A-spezifisch (ELAGIGILT), HLA-A*0201-restringiert	C. Wehner	
K562	Chronische myeloische Leukämiezelllinie, Suspensionszellen		Lozzio und Lozzio, 1975
LCL-MS¹	EBV transformiert B-Zellen (Überstand Wirtszelllinie B95-8), Suspensionszellen	S. Milošević	
Mel A375	Melanomzelllinie; HLA-A2-positiv; Tyrosinase- und Melan-A-negativ, adherent	ATCC	
Mel 624.38	Melanomzelllinie; HLA-A2-positiv; Tyrosinase-positiv, Melan-A-positiv, adherent	M.C. Panelli	Rivoltini et al., 1995
mLCL-MRE¹	Mini-EBV transformiert B-Zellen (Überstand EBV-Pack-Zelllinie), Suspensionszellen	C. Ellinger	
mLCL-SJ¹	Mini-EBV transformiert B-Zellen (Überstand EBV-Pack-Zelllinie), Suspensionszellen	A. Moosmann/ C. Wehner	
PBL¹	Nach Plattenadherenz, von gesunden Spendern, Suspensionszellen	C. Wehner	

¹ HLA-Typisierung siehe Tab. 8.7

Tab. 2.10: Verwendete Bakterien

Name	Charakteristika	Quelle
<i>E. coli</i> XL1 Blue MRF'	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIq</i> Δ M15 Tn10 TetR], Tetracyclin-Resistenz	Stratagene

2.7 Plasmide, Tetramere, Primer und Oligonukleotide

Tab. 2.11: Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Resistenz	Quelle
pcDNA3.1 MLVg/p	<i>gag-pol</i> -Gen des murinen Leukämievirus (Mo-MLV)	Ampicillin	C. Baum
pALF-10A1	Verpackungsplasmid(<i>env</i> -Gen des MLV-10A1)	Ampicillin	W. Uckert
pGEM-4Z-A116	T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt	Ampicillin	S. Milošević

Plasmid	Eigenschaften	Resistenz	Quelle
pGEM-eGFP-A116	T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, eGFP-DNS	Ampicillin	S. Milošević
pGEM-XAGE-1-A116	T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, XAGE-1-DNS	Ampicillin	C. Wehner
pGEM-GAGE-1-CrossTag-A116¹	pGEM-GAGE-1-CrossTag-A ₁₁₆ ¹ T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, GAGE-1-DNS	Ampicillin	C. Ellinger
pGEM-MAGE-A4-CrossTag-A116¹	pGEM-MAGE-A4-CrossTag-A ₁₁₆ ¹ T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, MAGE-A4-DNS	Ampicillin	C. Ellinger
pGEM-Melan-A_(ELA)-A116¹	T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, Melan-A _(ELA) -DNS (modifiziert)	Ampicillin	C. Ellinger
pGEM-Melan-A_(ELA)-CrossTag-A116¹	pGEM-Melan-A _(ELA) -CrossTag-A ₁₁₆ ¹ T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, Melan-A _(ELA) -DNS (modifiziert)	Ampicillin	C. Ellinger
pGEM-NY-ESO1-CrossTag-A116¹	pGEM-NY-ESO-1-CrossTag-A ₁₁₆ ¹ T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, NY-ESO-1-DNS	Ampicillin	C. Ellinger
pGEM-SSX4-CrossTag-A116¹	pGEM-SSX4-CrossTag-A ₁₁₆ ¹ T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, SSX4-DNS	Ampicillin	C. Ellinger
pGEM-XAGE-1-CrossTag-A116¹	pGEM-XAGE-1-CrossTag-A ₁₁₆ ¹ T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, XAGE-1-DNS	Ampicillin	C. Ellinger
pGEM-αD115-TZR-A116	T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, Tyrosinase-spezifischer TZR, α-Kette D115-DNS	Ampicillin	S. Wilde
pGEM-βD115-TZR-A116	T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, Tyrosinase-spezifischer TZR, β-Kette D115-DNS	Ampicillin	S. Wilde
pGEM-Tyrosinase-A116¹	T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, Tyrosinase(YMD-Variante)-DNS	Ampicillin	C. Ellinger
pGEM-YMD-eGFP-A116¹	T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, Tyrosinase(YMDGTMSQV)-DNS gekoppelt an eGFP-cDNS	Ampicillin	C. Wehner
pVA1-2-EBNA-1-TZR-A116¹	T7-Promotor, polyA ₁₁₆ -Abschnitt, EBNA-1-spezifischer TZR, α-Kette EBNA-1-DNS	Ampicillin	C. Wehner (TZR von S. Milosevic)

Plasmid	Eigenschaften	Resistenz	Quelle
pVA17-M244-TZR-A70¹	T7-Promotor, polyA ₇₀ -Abschnitt, XAGE-1-spezifischer TZR, α-Kette M244-DNS	Ampicillin	C. Wehner
pVB3-1-M244-TZR-A70¹	T7-Promotor, polyA ₇₀ -Abschnitt, XAGE-1-spezifischer TZR, β-Kette M244-DNS	Ampicillin	C. Wehner

¹ Siehe Methoden, Abschnitt 3.2.9 (Abb. 3)

Tab. 2.12: Tetramer

	Peptidsequenz	Quelle
HLA-A*0201/Melan-A _(ELA) /Hβ2m	E <u>L</u> AGIGILT	D. Busch

Tab. 2.13: Primer

Primer	Sequenz 5' nach 3'			
Antigenklonierung (pGEM-A116)				
XAGE-1	5'	ATAAAGCTT _(HindIII) ATGCTCCTTTGGTGCCCACC		
	3'	ATAGAATTC _(EcoRI) TCATCACCAAACCTTGTTGGTTGCTCT		
Mutagenese (ein Aminosäurenaustausch)				
YMN → YMD-GFP	5'	CCACCATGGCCTATATGGATGGAACAATGTCCCAG		
	3'	CTGGGACATTGTTCCATCCATATAGGCCATGGTGG		
Quantitative <i>real-time</i> PCR	Sequenz 5' nach 3'		Amplifikat- länge (bp)	Schmelztem- peratur
cTAGE-1	5'	TTGGTGGGAACAACCTTTATCCA	156	79,2
	3'	TACTCCTTCCCCTTGCCACA		
GAGE-1	5'	AGTTGGCGAGGAAGATCGAC	321	87,4
	3'	TTCAGGCGTTTTCACCTCCT		
MAGE-A4	5'	TATCGAGCCAAGGAGCTGGT	342	86,1
	3'	AGTGTGCTCCCTCCCATCAT		
NY-ESO-1 (Kurashige et al., 2001)	5'	AGTTCTACCTCGCCATGCCT	386	89,7
	3'	TCCTCCTCCAGCGACAAACAA		
SSX4	5'	GAGACCCAGGGATGATGCTC	363	84,1
	3'	GATGCCTCTGGCACTTCCTT		
XAGE-1	5'	CATGTTCACTGGGCGTCTTC	400	89,5
	3'	TGCTCTTCACCTGCTTCTGG		
αEnolase (Dr. Marion Frankenberger, HHZ)	5'	GTTAGCAAGAAACTGAACGTC	619	88,4
	3'	ACA TGAAGGACTTGTACAGGTCAG		
18S RNS	5'	CGGCTACCACATCCAAGGAA	186	
	3'	GCTGGAATTACCGCGGCT		

Primer	Sequenz 5' nach 3'	
Sequenzierung		
T7 (pGEM-Plasmide)	5'	TAATACGACTCACTATAGGG
TZR-Vβ-Repertoire		
P-5'βST	5'	AAGCAGAGATCTCCACAC
P-3'βST	3'	GAGGTAAAGCCACAGTTGCT
P-3'CβII	3'	GATGGCTCAAACACAGCGACCTC
Vβ1	5'	GCACAACAGTTCCTGACTTGGCA C
Vβ2	5'	TCATCAACCATGCAAGCCTGACCT
Vβ3	5'	GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC
Vβ4	5'	ACATATGAGAGTGGATTTGTCATT
VSS5.1	5'	ATACTTCAGTGAGACACAGAGAAAC
Vβ5.2	5'	TTCCCTAACTATAGCTCTGAGCTG
Vβ6.1	5'	GCCCAGAGTTTCTGACTTACTTC
Vβ6.3	5'	ACTCTGAAGATCCAGCGCACA
Vβ7	5'	CCTGAATGCCCCAACAGCTCTC
Vβ8	5'	ATTTACTTTAACAACAACGTTCCG
Vβ8S3	5'	GCTTACTTCCGCAACCGGGCTCCT
Vβ9	5'	CCTAAATCTCCAGACAAAGCT
Vβ10	5'	CTCCAAAACTCATCCTGTACCTT
Vβ11	5'	TCAACAGTCTCCAGAATAAGGACG
Vβ12	5'	AAAGGAGAAGTCTCAGAT
Vβ12S3	5'	GCAGCTGCTGATATTACAGAT
Vβ13	5'	TCGACAAGACCCAGGCATGG
Vβ13.1	5'	CAAGGAGAAGTCCCCAAT
Vβ13.2	5'	GGTGAGGGTACAACCTGCC
Vβ13S5	5'	ATACTGCAGGTACCACTGGCA
Vβ14	5'	GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAAT
Vβ15	5'	AGTGTCTCTCGACAGGCACAGGCT
Vβ16	5'	AAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCC
Vβ17	5'	CAGATAGTAAATGACTTTTCAG
Vβ18	5'	GATGAGTCAGGAATGCCAAAGGAA
Vβ19	5'	CAATGCCCCAAGAACGCACCCTGC
Vβ20	5'	AGCTCTGAGGTGCCCCAGAATCTC
Vβ21	5'	AAAGGAGTAGACTCCACTCTC
Vβ22.1	5'	CATCTCTAATCACTTATACT

Primer	Sequenz 5' nach 3'
Vβ22.2	5' AAGTGATCTTGCGCTGTGTCCCCA
Vβ22.3	5' CTCAGAGAAGTCTGAAATATTCG
Vβ23	5' GCAGGGTCCAGGTCAGGACCCCCA
Vβ24	5' ATCCAGGAGGCCGAACACTTCT
Degenerierte Primer für TZR-Vβ-Gensegment Familien (Zhou, D. et al., 2006)	
CP1	3' GCACCTCCTTCCCATTAC
VP1	5' GCIITKTIYTGGTAYMGACA (I = Inosin, W = A/T, M = A/C, Y = C/T, K = G/T)
VP2	5' CTITKTWTTGGTAYCIKCAG (I = Inosin, W = A/T, M = A/C, Y = C/T, K = G/T)
TZR-Vα-Repertoire	
Primer	Sequenz 5' nach 3'
P-5'αST	5' CTGTGCTAGACATGAGGTCT
P-3'αST	3' CTTGCCTCTGCCGTGAATGT
3'T-Cα	3' GGTGAATAGGCAGACAGACTTGTCAGTGA
PANVα1	5' AGAGCCCAGTCTGTGASCCAG S=C/G
PANVα1.1	5' AGAGCCCAGTCRGTGACCCAG R=A/G
Vα2	5' GTTTGGAGCCAAACRGAAGGAG
Vα3	5' GGTGAACAGTCAACAGGGAGA
Vα4	5' TGATGCTAAGACCACMCAGC
Vα5	5' GGCCCTGAACATTCAGGA
Vα6	5' GGTCACAGCTTCACTGTGGCTA
Vα7	5' ATGTTTCCATGAAGATGGGAG
Vα8	5' TGTGGCTGCAGGTGGACT
Vα9	5' ATCTCAGTGCTTGTGATAATA
Vα10	5' ACCCAGCTGCTGGAGCAGAGCCCT
Vα11	5' AGAAAGCAAGGACCAAGTGTT
Vα12	5' CAGAAGGTAACCAAGCGCAGACT
Vα13	5' GAGCCAATTCCACGCTGCG
Vα14	5' CAGTCTCAACCAGAGATGTC
Vα14.1	5' CAGTCCCAGCCAGAGATGTC
Vα15	5' GATGTGGAGCAGAGTCTTTTC
Vα16	5' TCAGCGGAAGATCAGGTCAAC
Vα17	5' GCTTATGAGAACACTGCGT
Vα18	5' GCAGCTTCCCTTCCAGCAAT
Vα19	5' AGAACCTGACTGCCCAGGAA

Primer	Sequenz 5' nach 3'
Vα20	5' CATCTCCATGGACTCATATGA
Vα21	5' GTGACTATACTAACAGCATGT
Vα22	5' TACACAGCCACAGGATACCCCTTCC
Vα23	5' TGACACAGATTCCTGCAGCTC
Vα24	5' GAACTGCACTCTTCAATGC
Vα25	5' ATCAGAGTCCTCAATCTATGTTTA
Vα26	5' AGAGGGAAAGAATCTCACCATAA
Vα27	5' ACCCTCTGTTCTGAGCATG
Vα28	5' CAAAGCCCTCTATCTCTGGTT
Vα29	5' AGGGGAAGATGCTGTACCA
Vα30	5' GAGG GAGAGAGTAGCAGT
Vα31	5' TCGGAGGGAGCATCTGTGACTA
Vα32	5' CAAATTCCTCAGTACCAGCA

Angegeben sind Sequenz und Verwendungszweck der in dieser Arbeit verwendeten DNS-Primer. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und angegeben. Alle Primer sind aus der 5' Richtung angegeben. Die Bezeichnungen der TZR-Vα/β-Gensegmentfamilien-spezifischen Primer richtet sich nach der Arden-Nomenklatur (Arden et al., 1995). **Fett** markierte Primer fungierten als jeweilige interne PCR-Kontrolle. Die Primersequenzen für die TZR-Vα/β-Ketten-Analyse beruhen auf Angaben von Steinle et al. (1995).

Tab. 2.14: Oligonukleotide

DNS-Oligonukleotide	Sequenz 5' nach 3'
TZR-M244 Vα-CDR3α (sense)	GCAACCGACGACGGCGCCAACAGCAAGCTGACCTTCGGCAAGGG CATCACCCCTGAGCGTGCGCCCCGACATCCAGAACCCCGAGCCCGC CGTGTACCAGCTGAAGGACCCCAGAAGCCAGGACAGCACCCCT
TZR-M244 Vα-CDR3α (anti-sense)	GTGCTGTCCTGGCTTCTGGGGTCCTTCAGCTGGTACACGGCGGGC TCGGGGTTCTGGATGTCGGGGCGCACGCTCAGGGTGATGCCCTTG CCGAAGGTCAGCTTGCTGTTGGCGCCG TCGTCGGTTGC
TZR-M244 Vβ-CDR3β (sense)	GCAAGCAGCCAGACCGGCTGGGAGACCCAGTACTTCGGCCCCCGG CACCCGCCTGCTGGTGCTGGAGGACCTGAGGAACGTGACCCAC CCAAG
TZR-M244 Vβ-CDR3β (anti-sense)	GTCACCTTGGGTGGGGTCACGTTCTCAGGTCCTCCAGCACCAGC AGGCGGGTGCCGGGGCCGAAGTACTGGGTCTCCAGCCGGTCTG GCTGCTTGC
TZR-EBNA-1 Vα-CDR3α (sense)	GCAGTGCGCGGCAGCTACAGCGGCGCCGGCAGCTACCAGCTGAC CTTCGGCAAGGGCACCAAGCTGAGCGTGATCCCCAACATCCAGAA CCCCGAGCCCGCCGTGTACCAGCTGAAGGACCCCAGAAGCCAGG ACAGCACCCCT

DNS-Oligonukleotide	Sequenz 5' nach 3'
TZR-EBNA-1 V α - CDR3 α (anti-sense)	GTGCTGTCCTGGCTTCTGGGGTCCTTCAGCTGGTACACGGCGGGC TCGGGGTTCTGGATGTTGGGGATCACGCTCAGCTTGGTGCCCTTG CCGAAGGTCAGCTGGTAGCTGCCGGCGCCGCTGTAGCTGCCGCG CACTGC
TZR-EBNA-1 V β - CDR3 β (sense)	GCAAGCAGCTTCACCGGCCAGGGCTACAACGAGCAGTTCTTCGGC CCCGGCACCCGCCTGACCGTGCTGGAGGATCTGAGGAACGTGAC CCCACCCAAG
TZR-EBNA-1 V β - CDR3 β (anti-sense)	GTCACCTTGGGTGGGGTCACGTTCTCAGATCCTCCAGCACGGTC AGGCGGGTGCCGGGGCCGAAGAACTGCTCGTTGTAGCCCTGGCC GGTGAAGCTGCTTGC

2.8 Klonierte T-Zell-Rezeptoren

Tab. 2.15: Eigenschaften und CDR3-Regionen des TZR-EBNA-1

Die Nomenklatur für die angegebenen V-, D- und J-Regionen richtete sich nach IMGT (Lefranc et al., 2009).

TZR α -CDR3-Sequenz	CAVRGSYSGAGSYQLTF
TZR β -CDR3-Sequenz	CASSFTGQGYNEQFF
TZR α -Kette	TRAV1-2 , TRAJ28
TZR β -Kette	TRBV5-1, TRBD1-1, TRBJ2-1
HLA-Restriktion	HLA-B*3502
Spezifität	EBNA-1-Peptid des EBV (HPVGEADYFEY)

Tab. 2.16: TZR-Analyse des XAGE-1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklons M244

Die Gesamt-RNS des XAGE-1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklons M244 wurde isoliert, in cDNS umgeschrieben und in einer PCR anhand von spezifischen Primern für die V α - bzw. V β -Kette des TZR analysiert. In der Tabelle aufgeführt sind die V α - bzw. V β - und J α - bzw. J β -Ketten (IMGT-Nomenklatur) sowie die CDR3-Region. (AS: Aminosäure)

	V-Segment	D-Segment	J-Segment	CDR3-Region (AS-Sequenz)
TZR α -Kette	TRAV17*01	-	TRAJ56*01	CATDDGANSKLTF
TZR β -Kette	TRBV3-1*01	TRBD1*01	TRBJ2-5*01	CASSQTGWETQYF

2.9 Peptide und Proteine

Tab. 2.17: Peptide

Peptid	Epitop	Quelle
Tyrosinase	YMDGTMSQVA	Metabion
EBNA-1	HPVGEADYFEY	Metabion

2.10 Antikörper

Tab. 2.18: Antikörper

Spezifität	Kunjugation	Isotyp	Klon	Quelle
CCR7 (CD197)	PE	Ratte IgG _{2a}	3D12	eBioscience, Frankfurt
CD3	FITC	Maus IgG ₁	UCHT1	BD, Heidelberg
CD3	APC	Maus IgG ₁	UCHT1	BD, Heidelberg
CD4	Hz450	Maus IgG ₁	RPA-T4	BD, Heidelberg
CD4	FITC	Maus IgG ₁	13B8.2	Beckman Coulter, Krefeld
CD4	APC	Maus IgG ₁	RPA-T4	BD, Heidelberg
CD8	FITC	Maus IgG ₁	HIT-8a	BD, Heidelberg
CD8	APC	Maus IgG ₁	RPA-T8	BD, Heidelberg
CD8	APC-Cy7	Maus IgG ₁	RPA-T8	BD, Heidelberg
CD8	PE	Maus IgG ₁	RPA-T8	BD, Heidelberg
CD14	FITC	Maus IgG _{2a}	M5E2	BD, Heidelberg
CD19	PE-Cy7	Maus IgG ₁	HIB19	eBioscience, Frankfurt
CD19	PercP-Cy5.5	Maus IgG ₁	SJ25C1	eBioscience, Frankfurt
CD25	PE-Cy7	Maus IgG ₁	M-A251	BD, Heidelberg
CD25	APC	Maus IgG _{2b}	4,00E+003	Miltenyi
CD40 ¹	–	Maus IgG ₁		M.Frentsch
CD56	PE	Maus IgG ₁	NKH-1	Beckman Coulter, Krefeld
CD69	PE	Maus IgG _{2b}	TP1.55.3	Immunotech
CD80	PE	Maus IgG ₁	L307.4	BD, Heidelberg
CD83	FITC	Maus IgG ₁	HB15e	BD, Heidelberg
CD86	PE	Maus IgG ₁	FUN-1	BD, Heidelberg
CD137	APC	Maus IgG ₁	4B4-1	BD, Heidelberg
CD154 (CD40L)	PE	Maus IgG ₁	TRAP1	BD, Heidelberg
CD209 (DC-SIGN)	FITC	Maus IgG _{2b}	DCN46	BD, Heidelberg
FcR-Blockierung	-			MACS, Bergisch Gladbach
HLA-DR	PE	Maus IgG _{2a}	G46-6	BD, Heidelberg
Isotypkontrolle, IgG ₁	PE, FITC	Maus IgG ₁	MOPC21	BD, Heidelberg
Isotypkontrolle, IgG _{2a}	PE	Maus IgG _{2a}	G155-178	BD, Heidelberg
maus-TZRβ-konstant	APC	Hamster IgG _{2a}	H57-597	BD, Heidelberg

Spezifität	Kunjugation	Isotyp	Klon	Quelle
anti-Melan-A	-	Maus IgG ₁	A103	Dako, Dänemark
panMHC-I	-	Maus IgG ₁	W32/6	E. Kremmer
panMHC-II	-	Maus IgG ₁	C23/43	Dako, Dänemark
Anti-Maus-IgG F(ab) ₂	PE	IgG F(ab) ₂		Jackson, Newmarket, UK

¹ CD40-Blockierungs-Antikörper

2.11 Personen

Ein herzliches Dankeschön geht an folgende Personen für die Bereitstellung verschiedener Materialien:

Milošević, S.	Institut für Molekulare Immunologie (IMI), Helmholtz Zentrum München
Mautner, J.	Klinische Kooperationsgruppe (KKG) Pädiatrische Tumorimmunologie, Helmholtz Zentrum München
Moosmann, A.	Klinische Kooperationsgruppe (KKG) Immunonkologie, Helmholtz Zentrum München
Ellinger, C.	Institut für Molekulare Immunologie (IMI), Helmholtz Zentrum München
Kremmer, E.	Institut für Molekulare Immunologie (IMI), Helmholtz Zentrum München
Busch, D.	Institut der Medizinischen Mikrobiologie, Immunologie and Hygiene, TU München

2.12 Verwendete Software

Tab. 2.19: Verwendete Software

Textverarbeitung	OpenOffice 3.0
Bildbearbeitung/Zeichenprogramme	Adobe Illustrator 2.0
	Adobe Photoshop 2.0
	OpenOffice Draw 3.0
FACS-Auswertung	FlowJo 8.6
Datenauswertung	Microsoft-Excell
	Graph Pad Prism 5.0
Statistische Auswertung	Graph Pad Prism 5.0
Virtuelle Klonierung	Clone Manager 8.0
Sequenzanalyse	Chromas Lite (Elektropherogramme)
	NCBI BLAST
	IMGT (TZR Sequenzanalyse)
Sequenzoptimierung	Jcat, www.jcat.de (Grote et al., 2005)

3 METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen oder anderen Organismen wurden alle Arbeiten zur Kultivierung eukaryotischer Zellen unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Materialien, Lösungen und Medien durchgeführt. Inkubiert wurden die Zellen im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C/6,5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

3.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Der Farbstoff Trypanblau diffundiert lediglich in tote Zellen wodurch diese von den ungefärbten, lebendigen Zellen unterschieden werden können. Ein Aliquot (10 µl) des Zellgemisches wurde im Verhältnis 1:10, bei hohen Zellkonzentrationen, oder 1:2, bei niedrigen Zellkonzentration mit der Trypanblau-Lösung gemischt. 10 µl der Farbstoff-Zell-Mischung wurde auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die Anzahl der ungefärbten Zellen wurde anhand eines Durchlichtmikroskops in mindestens zwei Großquadraten, bestehend aus 16 Kleinquadraten, bestimmt. Die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat wurde mit dem Kammerfaktor 1×10^4 und dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert, woraus sich die Anzahl der Zellen in einem Milliliter Zellsuspension ergab.

3.1.2 Einfrieren von Zellen

Abgesehen von PBMZ und PBL wurden für alle Zelltypen zwischen $0,5 - 1 \times 10^7$ Zellen und für PBMZ oder PBL 5×10^7 Zellen abzentrifugiert und in 1 ml Einfriermedium (ibidi Freezing Medium, serumfrei) resuspendiert und in ein 1,8 ml-Kryo-Röhrchen (Nunc) überführt. Die Kryo-Röhrchen wurden in Nalgene® Cryo 1°C Freezing Container (Thermo-Scientific) auf -80°C herunter gekühlt und für langfristige Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) transferiert.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden diese in 12 ml vorgewärmtem RPMI 1640 Medium

(Raumtemperatur) zügig resuspendiert und in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen in vorgewärmten Kulturmedium (37°C) aufgenommen.

3.1.4 Generierung von Mini-LCL-Zelllinien

Zur Immortalisierung von B-Zellen eignet sich besonders das Epstein-Barr-Virus (EBV), das in vitro die Zellen infizieren und transformieren kann. Das Virus induziert das Wachstum einer dauerhaften lymphoblastoiden Zelllinie (LCL, engl. *lymphoblastoid cell line*) (Pope et al., 1968). Alternativ können B-Zellen mit Hilfe eines gentechnisch veränderten EBV-Stammes transformiert werden, der noch im Stande ist B-Zellen zu infizieren und zu transformieren, aber durch das Fehlen der meisten lytischen Gene nicht mehr in den lytischen Zyklus eintreten kann (Kempkes et al., 1995; Moosmann et al., 2002). Durch eine EBV-Verpackungs-Zelllinie ist es möglich, ohne das Risiko einer Kontamination durch ein Helfervirus das Replikations-defiziente Mini-EBV-Genom in einer Virionform zu generieren. Diese Virionen können selbstständig B-Zellen infizieren und immortalisieren (Delecluse et al., 1999). Die so transformierten B-Zellen werden als Mini-LCL (mLCL, engl. *mini lymphoblastoid cell line*) bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden B-Zellen in PBMZ eines Spenders anhand des Mini-EBV-enthaltenden Überstandes der Wirtszelllinie B95-8 (periphere Blutlymphozyten des Krallenaffen, freundlicherweise von Andreas Moosmann bereitgestellt) immortalisiert (Miller, G. und Lipman, 1973; Farrell, 2001). Hierfür wurden $1 - 0,5 \times 10^6$ PBMZ in 100 µl LCL-Medium mit 100 µl EBV-Überstand und 1 µg/ml Cyclosporin A in einer 96-Loch-Platte (Flachboden) versetzt. Cyclosporin A (CSA) blockiert die Calcineurin-Aktivität, ein Schlüsselenzym der T-Zell-Aktivierung, wodurch die Genexpression verschiedener Zytokine sowie deren Rezeptoren inhibiert wird und dadurch zelluläre Bestandteile des Immunsystems sterben (Mascarell und Truffa-Bachi, 2003). Auf der anderen Seite weist CSA eine unterstützenden Wirkung auf die EBV-Transformation und Entwicklung immortalisierter humaner B-Lymphocyten auf (Walz et al., 1990; Chen et al., 2009). Somit wird eine CSA-vermittelte Selektion auf EBV-transformierte B-Zellen ermöglicht.

3.1.5 Kultivierung von LCL/mLCL-Zelllinien

In stehenden 25 cm² (15 ml Medium) oder 75 cm² (50 ml Medium) Zellkulturflaschen (BD) wurden im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C/6,5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit LCL und mLCL in LCL-Medium kultiviert. Die in Suspension wachsenden Zellen wurden etwa alle drei bis fünf Tage 1:5 gesplittet und mit frischem LCL-Medium (12 ml bzw. 40 ml) versetzt.

3.1.6 Kultivierung adhärenter Tumorzellen

Adhärente humane Tumorzelllinien wie Mel624.38 und MelA375 wurden in liegenden 75 cm² Zellkulturflaschen (BD) mit 20 ml LCL-Medium im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C/6,5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Etwa alle drei bis vier Tage wurden die Zellen 1:5 oder 1:10 gesplittet. Hierfür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml 1 x Trypsin/EDTA-Lösung für 5 – 10 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Zellen von der Oberfläche zu lösen. Der Verdau wurde mit 10 ml LCL-Medium abgestoppt. In eine neue Zellkulturflasche wurde 1/5 oder 1/10 der gelösten Zellen transferiert und mit LCL-Medium auf ein Endvolumen von 20 ml aufgefüllt.

3.1.7 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Tumorzellen K562 sowie LCL/mLCL sind in Suspension wachsende Zellen, die in stehenden 75 cm² Zellkulturflaschen (BD) mit 50 ml LCL-Medium im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C/6,5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert wurden. Etwa alle drei bis vier Tage wurden die Zellen 1:5 gesplittet und mit frischem LCL-Medium versehen.

3.1.8 Kultivierung etablierter T-Zellklone

Etablierte T-Zellklone wurden alle 14 Tage restimuliert. Hierfür wurden pro Kavität einer 24-Loch-Flachbodenplatte 1 x 10⁶ T-Zellen mit 1 x 10⁶ bestrahlten PBL vier verschiedener Spender (50 Gy, Bestrahlungsanlage ¹³⁷Cs, HWM-D-2000 Gammacell), 1 x 10⁵ bestrahlten Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), 250 ng/ml Phytohämagglutinin (PHA) oder je 30 ng/ml Anti-CD3/-CD28 und 50 U IL-2/ml in 2 ml T-Zellmedium gemischt. Der CD8⁺ T-Zellklon IVSB (Tyrosinase-spezifisch, HLA-A*02:01-restringiert) wurde mit der Melanomzelllinie Mel624.38 (100 Gy, Bestrahlungsanlage ¹³⁷Cs, HWM-D-2000 Gammacell) und der T-Zellklon JB4 (HLA-A*02:01-spezifisch) mit einer HLA-A*02:01-positiven mLCL-Linie (mLCL-MRE, 100 Gy, Bestrahlungsanlage ¹³⁷Cs, HWM-D-2000 Gammacell) als APZ stimuliert. Spätestens vier Tage nach Restimulation wurde der PHA-haltige Kulturüberstand abgenommen und durch 2 ml frisches T-Zellmedium mit 50 U/ml IL-2 ersetzt. Im Folgenden wurde alle drei Tage 1 ml Medium pro Kavität durch frisches Medium mit 50 U/ml IL-2 ausgetauscht und wenn nötig die Zellen 1:2 gesplittet. Die T-Zellen wurden an Tag 14 nach Stimulation bei Bedarf wie unter 3.1.2 beschrieben eingefroren.

3.1.9 Anreicherung von humanen mononukleären Zellen des Blutes (PBMZ) aus Frischblut

Mononukleäre Zellen aus Frischblut wurden anhand der Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung des synthetischen Copolymers Ficoll (Biochrome) angereichert. Das Spenderblut wurde bei Abnahme heparinisiert und anschließend im Verhältnis 1:2 mit sterilem PBS (low endotoxin, Biochrom AG) gemischt, wovon jeweils 35 ml auf 15 ml Ficoll überschichtet wurde. Nach der Zentrifugation für 18 Minuten bei 840 x g ohne Bremse wurden 15 ml der obersten Phase abgenommen und der Zentrifugationsschritt wiederholt (Thrombozytenwäsche). Danach wurden jeweils zwei Interphasenringe gemischt, mit sterilem PBS auf 50 ml Endvolumen aufgefüllt und für 10 Minuten bei 470 x g mit Bremse zentrifugiert. Jeweils zwei Zellsedimente wurden zusammengeführt und ein weiteres Mal mit sterilem PBS (Endvolumen 50 ml; 470 x g für 10 Minuten mit Bremse) gewaschen. Für die zweite Thrombozytenwäsche wurden erneut zwei Zellsedimente gemischt und jeweils 40 ml PBS mit 0,5% Humanserum dazugegeben und die Zellen resuspendiert. Nach der Zentrifugation für 15 Minuten bei 130 x g ohne Bremse wurde dieser Schritt wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 15 ml DZ-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

3.1.10 Generierung von 3-Tage DZ (3d-DZ)

Für die Generierung von 3d-DZ wurden zunächst Monozyten mit Hilfe der Plastikadhärenz aus den PBMZ isoliert. Hierfür wurden 75×10^6 PBMZ in 15 ml DZ-Medium in eine 80 cm²-Nunc™ Δ Surface-Zellkulturflasche (Thermo Scientific) gegeben und leicht geschwenkt, um die Zellen möglichst gleichmäßig zu verteilen. Nach 25-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die liegende Flasche kurz geschwenkt und für weitere 25 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden alle nicht adhärennten Zellen mit dem Überstand entfernt und die adhärennten Zellen mit jeweils 15 ml DZ-Medium durch leichtes Schwenken zweimal gewaschen. Für die Ausreifung zu zunächst unreifen iDZ (engl. *immature DC*) wurden 15 ml DZ-Medium mit 20 ng/ml IL-4 und 100 ng/ml GM-CSF versetzt und in die Flasche gegeben. Für die Generierung reifer mDZ (engl. *mature DC*) wurde am dritten Tag der Maturierungscocktail (siehe Tab. 3.1) in DZ-Medium dazu gegeben. Am vierten Tag war der Reifungsprozess beendet und die DZ konnten für Experimente gesammelt und verwendet werden.

Tab. 3.1: Zytokinzugabe und Maturierungs-Cocktails für die Generierung von mDZ

	Jonoleit-Cocktail¹	Cocktail 5²	Cocktail 6³
DZ-Medium	3 ml	6 ml	6 ml
GM-CSF	1800 ng	2100 ng	2100 ng
IL-4	360 ng	420 ng	420 ng
IL-1β	180 ng	210 ng	210 ng
TNFα	180 ng	210 ng	210 ng
INFγ	-	105 000 U	105 000 U
R848	-	-	21 000 ng
PGE₂	18 000 ng	5 250 ng	5 250 ng
Poly(I:C)	-	420 ng	420 ng

¹ mDZ generiert nach Jonuleit *et al.* (1997), verkürzt von 7 Tage auf 3 Tage von M. Bürdek (2010)

² 3-Tage-mDZ generiert nach verkürztem Protokoll unter Verwendung von poly(I:C) (Spranger *et al.* 2010)

³ 3-Tage-mDZ generiert nach verkürztem Protokoll unter Verwendung von TLR-Liganden und Poly(I:C) (5C+R848; Spranger *et al.*, 2010)

3.1.11 Ivt-mRNS-Transfektion verschiedener Zelltypen

Die Zellen wurden mit ivt-mRNS unter Verwendung des „Gene Pulser Xcell™“ (Biorad) in 0,4 cm Elektroporationsküvetten (Biorad) transfiziert. Dazu wurden die Zellen einmal mit kaltem RPMI 1640 (*very low endotoxin*, Biochrom AG) gewaschen, bei 470 x g zentrifugiert und das Zellsediment in kaltem RPMI aufgenommen, wobei die Zellzahl auf 2 – 3 x 10⁶ Zellen pro 200 μ l RPMI eingestellt wurde. Nach Zugabe der ivt-mRNS (siehe Abbildungen für Mengenangaben) wurde die 200 μ l Zellsuspension kurzfristig auf Eis gestellt und, unter den in Tab. 3.2 nachzulesenden Bedingungen, elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen sofort mit dem für sie geeigneten Kulturmedium gemischt und für einige Stunden in 24- oder 6-Loch-Flachboden-Kulturplatten (Falcon bzw. TPP) bei 37°C inkubiert. Zellen, die als Negativkontrolle mit H₂O statt ivt-mRNS elektroporiert worden waren, wurden in dieser Arbeit als „Kontroll-transfiziert“ bezeichnet.

Tab. 3.2: Elektroporationsbedingungen für verschiedene Zelltypen

Zellen	Elektroporationsprogramm	Bedingungen	Zellzahl	Volumen (RPMI)
3d-DZ	exponentiell	300 V, 300 μ F	2-3 x 10 ⁶	200 μ l
mLCL/LCL	exponentiell	300 V, 150 μ F	2-3 x 10 ⁶	200 μ l
PHA oder CD3/CD28-expandierende PBL	time constant	900 V; 2,3 ms	1,8-2 x 10 ⁶	200 μ l
	time constant	760 V; 2,5 ms	1,8-2 x 10 ⁶	200 μ l
CD8⁺ T-Zellklon IVSB	time constant	760 V; 2,5 ms	1,8-2 x 10 ⁶	200 μ l
CD8⁺ T-Zellklon JB4	time constant	400 V; 2,5 ms	1,8-2 x 10 ⁶	200 μ l

3.1.12 Peptid-Beladung von LCL

Für die Peptid-Beladung von LCL wurden jeweils zwei Millionen Zellen in 1 ml LCL-Medium in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 10 ng Peptid für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 470 x g für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert.

3.1.13 De-novo-Induktion naiver CD8⁺ T-Zellen

Für die De-novo-Induktion naiver CD8⁺ T-Zellen wurden diese mit Antigen-beladenen mDZ oder, für den allogenen Kontrollansatz, mit H₂O-elektroporierten mDZ kokultiviert. Im Falle der Antigen-beladenen mDZ wurden diese in Aliquots aufgeteilt, mit verschiedenen CrossTAg-Antigen-ivt-mRNS-Spezies (GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4, XAGE-1) transfiziert und für etwa fünf Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die mDZ zu gleichen Teilen wieder gemischt. Zur Überprüfung der Elektroporationseffizienz wurde ein Teil der mDZ mit GFP-ivt-mRNS transfiziert. Pro Kavität einer 24-Loch-Flachboden-Kulturplatte wurden 1 x 10⁶ aufgetaute PBL mit 0,5 x 10⁶ Zellen der mDZ-Mischpopulation in 2 ml T-Zellmedium zusammengeführt. Nach zwei Tagen wurden 20 U/ml IL-2 und 5 ng/ml IL-7 dazugegeben. Im Folgenden wurden etwa alle zwei Tage 20 U/ml IL-2 und 5 ng/ml IL-7 in die Kokultur gegeben und bei Bedarf die Zellen 1:2 gesplittet. Überschüssige mDZ-Aliquots wurden zur späteren Verwendung für die Restimulation der T-Zellen in IBIDI-Einfriermedium bei -80°C weggefroren. Nach 14 Tagen wurden die T-Zellen erneut mit aufgetauten, transfizierten mDZ-Mischpopulationen oder H₂O-elektroporierten mDZ im gleichen Verhältnis wie zu Beginn restimuliert. CD8⁺ T-Zellen wurden 16 Stunden nach der Restimulation über den Aktivierungsmarker CD137 anhand des Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (FACS Aria III, BD) isoliert und separat in 96-Loch-Platten (1 Zelle/Loch, 3 Zellen/Loch oder 6 Zellen/Loch) weiter kultiviert.

3.1.14 Kultivierung sortierter CD8⁺ T-Zellklone

Die in 96-Loch-Platten klonierten CD8⁺ T-Zellen wurden alle 14 Tage mit einem T-Zell-Stimulationsgemisch (200 µl) restimuliert. Das Stimulationsgemisch bestand aus 2 x 10³ Zellen einer Mischung unterschiedlich (CrossTAg)-Antigen-ivt-mRNS-transfizierter mLCL des DZ-Spenders (GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4, XAGE-1; bestrahlt mit 100 Gy, Bestrahlungsanlage ¹³⁷Cs, HWM-D-2000, Gammacell) und 3 x 10⁴ Zellen einer Mischung dreier unterschiedlicher PBL-Spender (bestrahlt mit 50 Gy) pro 200 µl T-Zellmedium, sowie 250 ng/ml PHA oder

30 ng/ml Anti-CD3/CD28 und 20U/ml IL-2 und 20 ng/ml IL-15. Nach drei Tagen wurde das PHA-haltige Kulturmedium entfernt und durch frisches T-Zellmedium mit 20 U/ml IL-2 und 20 ng/ml IL-15 ersetzt.

3.1.15 Koinkubation von T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APZ)

Zur Bestimmung der sezernierten Zytokinmenge nach spezifischer Stimulation, wurden T-Zellen und entsprechende APZ für die Analyse mittels ELISA kokultiviert. Zur Vermeidung unspezifischer Zytokinsekretion wurden die T-Zellen mindestens drei Tage vor der Kokultivierung ohne IL-2-Zugabe kultiviert. Außerdem wurden nur sich in der Ruhephase befindlichen T-Zellen verwendet, d.h. die T-Zellen wurden erst ab dem 10.Tag nach Stimulation für die Reaktivierung in der Kokultur eingesetzt. Hierfür wurden T-Zellen und APZ abzentrifugiert (470 x g, fünf Minuten) und anschließend in gewünschter Konzentration in T-Zellmedium resuspendiert. Die Kokultur wurde in einem Endvolumen von 200 µl in 96-Loch-Rundbodenplatten angesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 16 bis 24 Stunden wurden die Kulturüberstände gesammelt und in eine neue 96-Loch-Rundbodenplatte transferiert. Für eine längerfristige Lagerung wurde die Platte mit den Überständen bei -20°C aufbewahrt.

3.1.16 Kultivierung adhärenter HEK-293T-Zellen

Für die Kultivierung und Expansion von HEK-293T-Zellen wurden diese in 20 ml 293T-Zellmedium in 15 cm Zellkulturplatten (Nunc) im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% inkubiert. Die leicht adhärent wachsenden Zellen wurden etwa alle 3 Tage von der Oberfläche abgespült und 1:10 oder 1:20 gesplittet.

3.1.17 Transfektion von HEK-293T-Zellen

HEK-293T-Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA3.1MLVg/p (*gag/pol*-Gen des murinen Leukämievirus (Mo-MLV)) und dem Verpackungsplasmid pALF-10A1 (*env*-Gen des MLV-10A1) sowie dem TZRα/β-codierenden retroviralen Vektor transfiziert, um infektiöse Virushüllen zu generieren, die die gewünschten TCRα/β-Plasmid-DNS trägt (Reuß et al. 2007). Für den Polyethylenimin-(PEI)-vermittelten Plasmid-Transfer (PEI-Transfektion) in Zellen der Linie HEK-293T wurden einen Tag zuvor $3,0 \times 10^6$ Zellen in 10 cm Zellkulturplatten (Nunc) mit 10 ml 293T-

Zellmedium ohne Antibiotika ausgesät. Wichtig hierbei war der Verzicht auf Trypsin/EDTA, um die Zellen von der Oberfläche zu lösen, da andernfalls die Zellen die Transfektion mit PEI nicht überleben. Pro Transfektion wurden 600 µl OptiMEM mit 10 ng pALF, 10 ng CeB und 10 ng TZR α oder TZR β , 67,5 µl PEI (1x, 1 mg/µl, pH 7,0) nacheinander (Reihenfolge ist einzuhalten) gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der 293T-Zellen wurde entfernt. Der Transfektionsansatz wurde mit 18 ml 293T-Zellmedium (ohne Antibiotika) gemischt und am Rande der 10 cm Platte vorsichtig zu den 293T-Zellen getropft, um die Zellen nicht von der Oberfläche zu lösen. Nach 3-tägiger Inkubation bei 37°C wurde der virushaltige Überstand gesammelt und durch 0,45 µm Filter (Millipore) filtriert, um Kontaminationen mit 293T-Zellen zu vermeiden. Es wurde nur soviel wie nötig Virusüberstand von den 293T-Zellen abgenommen und das Volumen durch frisches 293T-Zellmedium ersetzt. Der filtrierte Virusüberstand wurde sofort für die erste Transduktion der PBL verwendet. Überschüssiger Virusüberstand wurde auf -20°C gelagert. Für die zweite Transduktion (Retronektin-vermittelte Infektion der PBL) wurde der restliche Überstand der 293T-Zellen abgenommen, filtriert und sofort eingesetzt.

3.1.18 Transduktion von Jurkat-76-Zellen

Für die Transduktion von Jurkat-76-Zellen mit Retroviren, die Melan-A-TZR α /β-Ketten enthielten, wurden 1×10^6 Jurkat-Zellen pro Kavität einer 24-Loch-Flachboden-Kulturplatte in 2 ml filtrierten Virusüberstand (1 ml TZR α -Kette + 1 ml TZR β -Kette tragender Virusüberstand) ausgesät. Die Zellen wurden so für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden pro Kavität einer 6-Loch-Flachboden-Kulturplatte mit 2 ml Retronektin (12 µg/ml) in sterilem PBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend wurde die Retronektin-PBS-Lösung entfernt und die Platte für 30 Minuten mit 2%iger BSA-Lösung geblockt. Nach Blockierung wurden 3 ml frisch abgenommener und filtrierter Virusüberstand (1,5 ml TZR α -Kette + 1,5 ml TZR β -Kette Virusüberstand) auf das Retronektin-beschichtete 6-Loch gegeben und zwei Stunden bei 4°C 4000 rpm (Rotana 460R, Hettich) zentrifugiert. Danach wurden die PBL aus der 24-Lochplatte in die 6-Lochplatte überführt und für weitere 10 Minuten bei 32°C 2000 rpm (Rotana 460R, Hettich) zentrifugiert. Nach Zugabe von Protaminsulfat und 50 U/ml IL-2 wurden die Zellen für vier Tage bei 37°C inkubiert bevor die Jurkat-Zellen aus den 6-Lochplatten in liegende 75 cm² Kulturfラスchen mit 20 ml T-Zellmedium und 50 U/ml überführt wurden. Nach weiteren drei Tagen erfolgte die Überprüfung der erfolgreichen Transduktion mit den TZR α /β-Ketten anhand des spezifischen Anti-Maus-TZR β -Kette-Antikörpers, der an den murinen Teil der exogenen TZR β -Kette band, im FACS.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Bakterienstamm und -kultur

Für alle hier beschriebenen bakteriellen Experimente wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) des Stammes XL1-Blue MRF' (Stratagene) verwendet. Auf Agarplatten ausplattierte Bakterien wurden in einem Inkubator, flüssige Bakterienkulturen in einem beheizbaren Schüttler kultiviert (jeweils 37°C). Für die langfristige Lagerung wurden Bakteriensuspensionen mit Glycerin (20%) versetzt und bei -80°C aufbewahrt. Da alle verwendeten Plasmide eine Ampicillin-Resistenzkassette aufwiesen, wurde sowohl auf den Agarplatten, als auch im flüssigen Kulturmedium (LB-Medium) mit dem Antibiotikum Ampicillin (50 µg/ml) auf Plasmid-tragende Bakterien selektiert.

3.2.2 DNS-Amplifikation mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden DNS-Fragmente amplifiziert (Mullis et al., 1986; Sambrook, 2000). Hierfür wurde der PCR Master Mix der Firma Promega gemäß der Herstellerbeschreibung eingesetzt. Die Reaktionen wurden im Thermocycler T1 (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Gemäß Sambrook et al. wurden die PCR-Standardbedingungen ausgewählt und Primer- bzw. Amplifikationsproduktlänge angepasst.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNS

Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgte unter zur Hilfenahme der Gelelektrophorese mit 1%igen Agarosegelen bei 5 – 10 V/cm. Die Gele wurden in einem Endvolumen von 200 ml 1x TAE-Puffer mit 1% Agarose in der Mikrowelle erhitzt und mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid gemischt. Die Fragmentgrößen wurden anhand parallel aufgetragener 1 kb-plus DNS-Leitern (Fermentas) oder 100 bp plus DNS-Standard-Leitern (Fermentas) bestimmt. Die DNS-Banden wurden mit einem UV-Transilluminator exponiert.

3.2.4 DNS-Extraktion aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung der DNS-Fragmente aus Agarosegelen wurden die auf dem UV-Transilluminator sichtbaren Banden ausgeschnitten und mittels "QIAquick® Gel Extraction"-Kits (QIAGEN) nach Vorgaben des Herstellers aufgereinigt.

3.2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNS wurde kommerziell von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) oder MWG (Ebersberg) durchgeführt. Das Programm Chromas lite (Technelysium) wurde für die bioinformatische Auswertung der Elektropherogramme verwendet.

3.2.6 DNS-Restriktionsverdau

Für die Klonierung von DNS-Fragmenten in entsprechende Expressionsvektoren oder zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung (Kontrollverdau) wurden die Produkte mit Restriktionsenzymen verdaut. Die Kontrollverdaue fanden in 20 µl Endvolumen mit etwa 1 µg DNS, 2 µl Puffer (10 x) und 5 Units Restriktionsenzym statt. Der Verdau der DNS-Fragmente erfolgte in einem 100 µl Ansatz, der 20 µg DNS, 10 µl Puffer (10 x) und 40 Units Restriktionsenzym enthielt. Die Verdaue wurden für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Wurden phosphorylierte DNS-Fragmente in Expressionsvektoren kloniert, wurden die Vektoren zur Hydrolyse freier Phosphatgruppen nach dem Verdau für weitere 30 Minuten bei 37°C mit der Alkalischen Phosphatase (CIP, engl. *calf intestine phosphatase*; NEB) behandelt. Wurden synthetisch hergestellte, nicht phosphorylierte Oligomere in Vektoren kloniert, wurde auf diesen Schritt verzichtet, um eine Ligation zu gewährleisten. Bei der Wahl der Enzyme wurde auf die Kompatibilität für einen Doppelverdau geachtet, d.h. es wurden entsprechende Pufferbedingungen für den optimalen Verdau durch beide Enzyme gewählt. War dies nicht möglich, wurde sequenziell verdaut.

3.2.7 Oligomer-Hybridisierung

Synthetisch hergestellte einzelsträngige DNS-Oligonukleotide (max. 145 Basen) wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) hergestellt und in lyophilisierter Form geliefert. Diese wurden in destilliertem H₂O gelöst (100 nM). Für die Herstellung doppelsträngiger DNS-Fragmente wurden Strang- und Gegenstrang-Oligonukleotide zu gleichen Teilen gemischt, für 5 – 10 Minuten auf 95°C erhitzt und innerhalb von zwei Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt. Die doppel-strängigen DNS-Fragmente mit entsprechenden Überhängen für die Ligation mit verdauter Plasmid-DNS konnten direkt eingesetzt werden. Für langfristige Lagerung wurden die Oligomere auf -21°C aufbewahrt.

3.2.8 Ligation von DNS-Fragmenten

Geschnittene Plasmid-DNS und einzufügende, geschnittene DNS-Fragmente wurden im Verhältnis 1:3 gemischt und mittels T4-Ligase über Nacht bei 16°C in einem 10 µl Ansatz (1 µl T4-Ligasepuffer (10x), 1 Unit T4-Ligase (NEB)) ligiert.

3.2.9 Generierung der Vektorkonstrukte

Im Folgenden wird die Konstruktion der verschiedenen Vektoren auf Grundlage des pGEM-A116-Vektors (Restriktionsschnittstellen-modifizierter pGEM-Vektor: pGEM-A116, modifiziert von S. Milošević; Vektorsequenz in Tab. 8.1) beschrieben. Der Vektor weist einen T7-Promotor, eine multiple Klonierungssequenz (MCS, *multiple cloning site*) und eine Poly-Adenin-Folge (polyA, A116) von 116 Nukleotiden auf. Für das Umschreiben der Plasmid-DNS (pDNS) in in vitro transkribierte (ivt)-mRNS wurde der Vektor anhand der *SpeI*-Schnittstelle, die sich in 3'-Richtung von dem Poly-A-Abschnitt befindet, linearisiert. Für die Selektion erfolgreich transformierter *E.coli* Bakterien enthielt das Plasmid außerdem eine Ampicilin-Resistenzkassette.

Das Plasmid pGEM-XAGE-1-A116-Vektor wurde durch Amplifikation des Antigens XAGE-1 aus einem bereits vorhandenen Vektor amplifiziert (S. Milosevic; XAGE-1 oder CT12.1; Gen-Identifikationsnummer: AF251237). XAGE-1 wurde mit den in Tab. 2.13 angegebenen Primern amplifiziert und anschließend mit *HindIII* und *EcoRI* für eine Stunde bei 37°C geschnitten. Mit den selben Enzymen wurde der pGEM-A116-Vektor für eine Stunde bei 37°C geschnitten, auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (120V, 45 Minuten) und der geschnittene Vektor aufgereinigt. Geschnittenes Amplifikat und aufgereinigter Vektor wurden über Nacht bei 16°C ligiert, in *E.coli* transformiert und korrekt ligierte Plasmide präpariert (s. Abschnitt 3.2.11 ff.).

Zur Rekonstitution der TZR-EBNA-1 und -M244 wurde der modifizierte pGEM-Vektor pVA-A116 für die TZR α -Kette bzw. pVB-A116 für die TZR β -Kette verwendet (CDR3-Sequenz nachzulesen in Tab. 2.14). Hierfür wurden sense- und antisense-Stränge der CDR3 α/β -Region mit Ja/ β -Region des jeweiligen Rezeptors synthetisch und sequenzoptimiert hergestellt (SIGMA Aldrich®). Die sense und antisense DNS-Stränge wurden hybridisiert (95°C, 5 Minuten, 10 µl pro DNS-Strang, die eine Konzentration von 10 pmol/µl hatten), wodurch aufgrund der Sequenzabfolge bereits am 5'-Ende die Schnittstelle *FspI* (*blunt end*) und am 3'-Ende die Schnittstelle *BstEII* (für β -TZR-Ketten; 5'-Überhang GTNAC) bzw. *DraIII* (für α -TZR-Ketten; 3'-Überhang NNN) enthalten war.

Im pGEM-Vektor-A116 war das Tyrosinase-Epitop YMNGTMSQV an die Sequenz von GFP gekoppelt. Für die Mutation der Aminosäurefolge von YMNGTMSQV zu YMDGTMSQV wurden Primer für die Mutagenese (QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit) konstruiert und synthetisch von der Firma Metabion (Martinsried) hergestellt. Die Durchführung erfolgte nach

Anleitung des „QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits“.

Die Konstruktion der verwendeten pGEM-LAMP-1-Antigen-DC-LAMP-A116-Vektoren (CrossTag-Antigen-A116-Vektoren) sind an anderer Stelle nachzulesen (Ellinger, 2013). Die Sequenzfolge des Grundvektors ist in Tab. 8.1 aufgeführt. Eine schematische Darstellung ist in Abb. 2 A und B zu sehen.

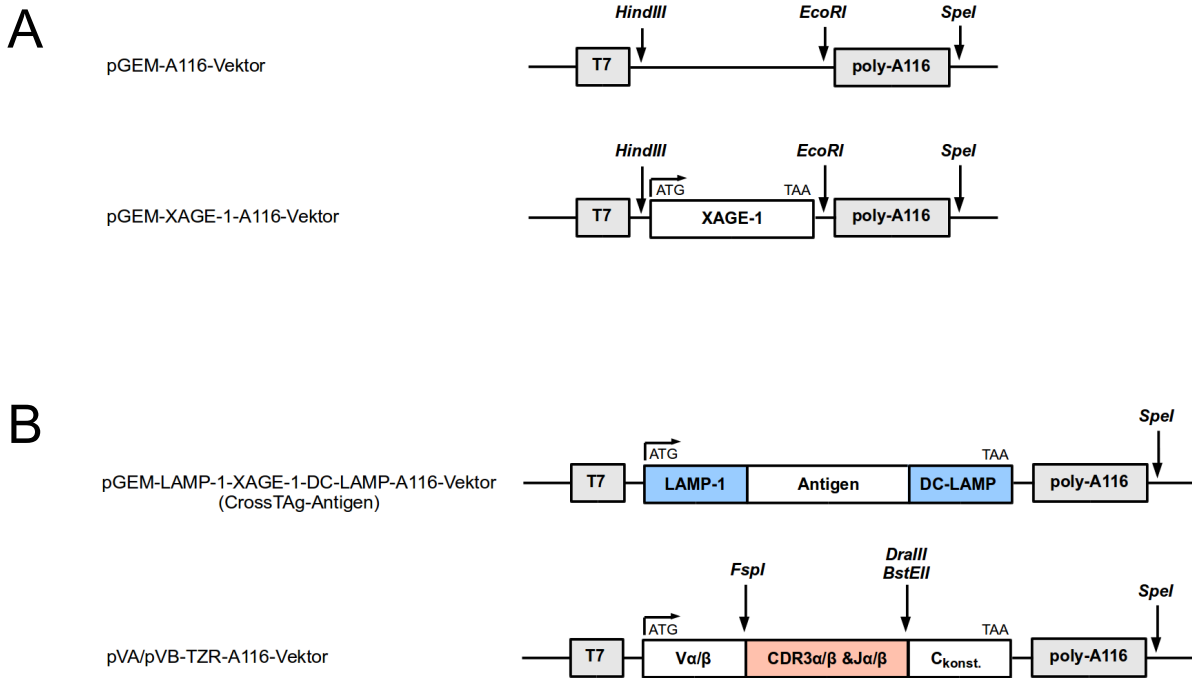


Abb. 3: Überblick der verwendeten Vektor-Konstrukte

(A) pGEM-A116 Vektoren: Markiert sind die Restriktionsschnittstellen, die relevant für die Klonierung (*HindIII*, *EcoRI*) von XAGE-1 bzw. für die Linearisierung (*SpeI*) waren. T7-Promotor und Poly-A-116-Sequenz sind grau unterlegt. (B) CrossTag-Vektor und TZR-Vektoren (pVA/pVB-TZR-A-116). Blau unterlegt sind die Signalsequenzen LAMP-1 und DC-LAMP bzw. orange unterlegt die austauschbare CDR3-/J-Region. C_{konst}: konstante C-Region; Va/β: variable α-/β-Kette.

3.2.10 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Bakterien

E. coli Bakterien des Stammes XL1-Blue MRF' (Stratagene) tragen eine Tetrazyklin-Resistenzkassette und wurden daher über Nacht bei 37°C auf Tetrazyklin-haltigen LB-Agarplatten (LB-Medium, SELECT Agar®, 20 µg/ml Tetrazyklin) ausplattiert und inkubiert. Am folgenden Tag wurden 400 ml LB-Medium (20 µg/ml Tetrazyklin) mit einer über Nacht gewachsenen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (190 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 300 ml der angewachsenen Bakteriensuspension verworfen und die verbliebenen 100 ml mit frischem LB-Medium (ohne Antibiotikum) auf 400 ml aufgefüllt. Unter Schütteln werden die Bakterien weiter bei 37°C kultiviert und in regelmäßigen Abständen die optische Dichte der Suspension bei 600 nm (OD₆₀₀) anhand eines Spektralphotometers (UltraSpec 1100 pro, Amersham Biosciences)

bestimmt. Bei Erreichen eines OD₆₀₀-Wertes von 1,0 wurden die Bakterien für 10 Minuten bei 4°C, 5100 x g abzentrifugiert. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis. Der Überstand wurde vollständig verworfen und das Zellsediment ohne Blasenbildung in 200 ml einer 10 %igen Glycerol-Lösung resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 Minuten, 4°C bei 5100 x g) wurde der Überstand erneut verworfen und der Schritt wiederholt. Das Zellsediment (aus einem anfangs 400 ml Ansatz) wurde abschließend in 2 ml Glycerol ohne Blasenbildung resuspendiert und in 90 µl Aliquots auf vorgekühlte Reaktionsgefäße verteilt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.11 Transformation elektrokompeter Bakterien mit Plasmid-DNS

Elektrokompente Bakterien wurden mit Ligationsprodukten transformiert, um diese zu amplifizieren. Hierfür wurden 20 µl elektrokompente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1,5 µl Ligation-DNS auf Eis gemischt. Das Gemisch wurde dann in vorgekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvetten (Biorad) transferiert und mittels im Elektroporator (X cell GenePulser, Biorad) voreingestellten Bedingungen für Bakterien (1,8 kV, 1 mm Küvetten) transformiert. Unmittelbar nach dem Elektropuls wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 Minuten bei 950 x g zentrifugiert und 800 µl des Überstandes verworfen. Das Zellsediment wurde in den verbliebenen 200 µl SOC-Medium resuspendiert, auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin (LB-Medium, SELECT Agar®, 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.12 Selektion und Expansion der transformierten Bakterien

Ausschließlich Bakterien, die erfolgreich mit der Plasmid-DNS, welche die Ampicillin-Resistenzkassette aufwies, transformiert wurden, konnten auf der Selektionsplatte mit Ampicillin (LB-Medium, SELECT Agar®, 50 µg/ml Ampicillin) Kolonien bilden. Diese wurden mit sterilen Pipettenspitzen in jeweils 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C und 190 rpm inkubiert. Verwendet wurden 1,5 ml der Vorkultur, um die Plasmid-DNS zu extrahieren und die Nukleotidsequenz überprüfen zu lassen (Firma MWG (Ebersberg) oder Firma Sequiserve (Vaterstetten)). Ergab die Sequenzierung eine fehlerfreie Nukleotidsequenz, wurden 300 ml LB-Medium (+ 50 µg/ml Ampicillin) mit 50 µl der entsprechenden Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 190 rpm inkubiert. Existierte bereits ein kryokonservierter Bakterienstock mit entsprechender Plasmid-DNS, wurden 300 ml LB-Medium (+ 50 µg/ml Ampicillin) mit etwa 5 µl der weggefrorenen Bakterien angeimpft. Am nächsten Tag erfolgte die Extraktion der Plasmid-DNS.

3.2.13 Plasmid-DNS-Extraktion aus transformierten Bakterien

Die Bakteriensuspension wurde über Nacht bei 37°C und 190 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 5100 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde restlos verworfen und die Plasmid-DNS gemäß der Anleitung des „JETstar Plasmid Purification MAXI“ (präparative Extraktion) Kits (Genomed) extrahiert.

3.2.14 Herstellung von Einzel-Spezies-ivt-mRNS

Mit Hilfe des „mMessage mMachine T7 Kit“ (Fa. Ambion) wurden Einzel-Spezies-ivt-mRNS hergestellt. Hierfür wurden zunächst 20 µg der Plasmid-DNS mit dem Restriktionsenzym *SpeI* über Nacht bei 37°C linearisiert. Danach wurde die Linearisierung (100 µl) abgestoppt und aufgereinigt: zu den 100 µl Verdau wurden 5 µl EDTA (0,5 M), 10 µl Na-Acetat (3 M) und 200 µl 100 %iger Ethanol dazugegeben und das Ganze für 45 Minuten auf -20°C gestellt. Nach der Zentrifugation bei 4°C für 15 Minuten und 15000 x g wurde der Überstand verworfen und das DNS-Sediment in 40 µl nuklease-freien H₂O resuspendiert. Die DNS-Konzentration wurde am UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, PEQLAB) bei OD₂₆₀ bestimmt. Für die Herstellung der ivt-mRNS wurden 2 µg linearisierte Plasmid-DNS eingesetzt und mit den Reagenzien nach Herstellerangaben vermischt. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die DNS durch Zugabe von DNase für weitere 30 Minuten bei 37°C verdaut, sodass nur noch die ivt-mRNS übrig blieb. Die Aufreinigung der ivt-mRNS erfolgte nach Herstellerangaben des „RNeasy Mini Kit“ (QIAGEN). Die ivt-mRNS wurde mit 35 µl Nuklease-freiem H₂O aus den Säulen gelöst. Die Konzentration wurde wiederum spektral photometrisch bestimmt (OD₂₆₀) und die RNS anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.15 Agarose-Gelelektrophorese von ivt-mRNS-Produkten

Zur Überprüfung der erfolgreichen ivt-mRNS-Synthese wurde eine Probe davon auf ein 1%iges Agarosegel (1% Ethidiumbromid; 1 x TAE-Puffer in DEPC-behandeltem H₂O) geladen. Hierfür wurden 0,5 µl ivt-mRNS mit 5 µl RNS-Ladepuffer (2x) und 4,5 µl Nuklease-freiem H₂O gemischt, für 10 Minuten auf 70°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen und anschließend auf das Gel geladen. Für die Längenkontrolle wurde zusätzlich eine RNS-Leiter (RiboRuler™ High Range RNA Ladder, Thermo Scientific) aufgetragen. Nach 45 Minuten bei 80 V wurden die RNS-Banden im UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

3.2.16 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde anhand der optischen Dichte bei 260 nm im UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, PEQLAB) bestimmt. Zur Überprüfung der Reinheit wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. DNS wird als rein angesehen, wenn der OD_{260}/OD_{280} -Quotient bei über 1,8 liegt, im Falle der RNS muss er sich über 2,0 befinden.

3.2.17 HLA-Typisierung

Für die HLA-Genotypanalyse eines Blutspenders wurden mLCL-Zellen (1×10^7 Zellen) in 3 ml LCL-Kulturmedium in ein 15-ml-Reaktionsgefäß an die Firma IMG (Martinsried) übersandt.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Funktioneller IFN- γ -ELISA

Die von der Firma BD erworbenen Reagenzien des „OptEIA™ Human ELISA Sets, IFN- γ “ wurden für die funktionelle Analyse im ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) verwendet. Eine 96-Loch-ELISA-Platte (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 Well; Nunc) wurde hierfür mit 50 μ l Beschichtungspuffer, der 1:200 mit IFN- γ -Capture-Antikörper gemischt wurde, beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten der Platte drei Mal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit 300 μ l 1 %iger Milchpulverlösung in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Nach 3-maligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurde ein in Dupletten angelegter Zytokinstandard und die Zytokin-haltigen Überstände der Kokulturen (Abschnitt 3.1.15) auf die Kavitäten verteilt. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen. Jede Vertiefung wurde mit 50 μ l 1%iger Milchpulverlösung versehen, die 1:200 mit IFN- γ -Detektion-Antikörper und Avidin-HRP-Konjugat gemischt wurde. Die Inkubation fand eine Stunde bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Lichteinwirkung statt. Nach siebenmaligem Waschen wurden 100 μ l Substratlösung (OptEIA™ TMB Substrate Reagent A und B zu gleichen Teilen; BD) pro Kavität verteilt und bei Raumtemperatur 10 – 30 Minuten stehen gelassen. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 50 μ l Phosphorsäure [1M] dazu gegeben. Die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen erfolgte anhand eines Spektralphotometers (ELISA Reader Sunrise, Tecan; Wellenlängenkorrektur bei 620nm) durch die Absorptionsmessung bei 450 nm.

3.3.2 Funktionelle Analyse von Effektorzellen mittels ELISpot

Eine sehr sensitive funktionelle Analyse offeriert der ELISpot (*Enzyme-Linked ImmunoSpot*), mit dem das von aktivierten Effektorzellen sezernierte IFN- γ detektiert werden kann. Dazu werden Effektor- und Zielzellen direkt auf einer Polyvinyl-difluorid (PVDF)-Membran kokultiviert, die mit monoklonalen Anti-IFN- γ -Antikörpern bedeckt ist. Das sezernierte IFN- γ wird von den Antikörpern in unmittelbarer Nähe gebunden. Anhand Enzym-konjugierter Detektionsantikörper kann das gebundenen IFN- γ unter Substratzugabe als blaue Punkte sichtbar gemacht werden. D.h jeder sichtbare Punkt repräsentiert eine Zytokin-sekretierende Effektorzelle.

Für die Durchführung der ELISpot-Analyse wurde der „ELISpot^{PRO} für humanes IFN- γ “ Kit von Mabtech verwendet. Die Antikörper-vorbeschichteten Platten wurden vier Mal mit 200 μ l sterilem PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit 300 μ l RPMI + 10% FKS pro Kavität blockiert. Nach Entfernen des Blockierungsmediums wurden Effektor- und Zielzellen 20 Stunden auf den ELISpot-Membranen bei 37°C/6,5% CO₂ kokultiviert. Danach wurden die Zellen entfernt und die Platte fünf Mal mit PBS gewaschen. Enzym-konjugierte Detektionsantikörper (7-B6-ALP) wurden 1:200 mit filtriertem PBS + 0.5% FKS gemischt und davon 100 μ l pro Kavität verteilt. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte fünf Mal mit PBS gewaschen bevor 100 μ l der filtrierten (0.45 μ m) Substratlösung (BCIP/NBT-plus) pro Kavität dazu gegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 10-20 Minuten wurde die Reaktion durch 10-maliges Waschen mit destilliertem H₂O abgestoppt und die Platten zum Luft-trocknen stehen gelassen. Die Anzahl der blauen Punkte pro Kavität wurde anhand des ELISpot-Analysegerätes „S6 FluoroSpot Analyzer line“ (C.T.L.) bestimmt.

3.4 Durchflusszytometrische Analysen

3.4.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Anhand direkt markierter monoklonaler Antikörper, die mit Fluoreszenzmarkern konjugiert waren, wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle verifiziert. Dazu wurden 0,1 - 1 x 10⁶ der zu untersuchenden Zellen in 50 μ l FACS-Puffer (PBS + 1% FKS) aufgenommen und mit entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörpern gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten im Dunkeln bei 4°C wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Für die lebend/tot-Färbung wurde die Zellsuspension mit Propidiumiodid (PI) oder DAPI in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml (PI) oder 60 ng/ml (DAPI) versetzt und anschließend sofort im Durchflusszytometer analysiert. Die aufgezeichneten Daten wurden mit Hilfe der

Flow-Jo-Software (Tree Star) ausgewertet. Für die Kompensation der Spektralüberlappungen wurde das „BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig, κ-Set“ (BD) herangezogen. Je 20 µl der positiven bzw. negativen Beads wurden mit 1 µl Antikörper und 100 µl FACS-Puffer gemischt.

3.4.2 Färbung intrazellulärer Proteine

Die erfolgreiche Transfektion und Expression von Melan-A-ivt-mRNS in DZ wurde mit Hilfe der intrazellulären Proteinfärbung überprüft. Hierzu wurden Reagenzien des „FoxP3 staining Kit“ (BD Bioscience) verwendet. Mit FACS-Puffer wurden $0,3 \times 10^6$ transfizierte mDZ gewaschen (1700 rpm, 4 Minuten) und anschließend in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die FcR-Blockierung erfolgte mit 2 µl Blockierungsantikörpern für 15 Minuten bei 4°C und danach mit 500 µl 1 x Permeabilisierungspuffer (1 x PP; nach Herstellerangaben angesetzt) gewaschen. Die Fixierung/Permeabilisierung erfolgte in 500 µl Fixierungs/Permeabilisierungspuffer (nach Herstellerangaben angesetzt) für 30 – 45 Minuten bei 4°C. Nach dem Waschschrift (500 µl 1 x PP) wurde das Zellsediment in 50 µl 1 x PP resuspendiert und 3 µl des primären Antikörpers (Anti-Melan-A-Antikörper, Dako) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 45 Minuten bei 4°C. Nach Entfernen des überschüssigen Antikörpers (500 µl 1 x PP; 4 Minuten 1700 rpm), wurde der PE-konjugierte sekundäre Antikörper dazugegeben (1:100 verdünnt in 50 µl 1 x PP) und für weitere 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach dem abschließenden Waschschrift wurde das Zellsediment in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte DZ mit den gleichen Antikörpern unter den gleichen Bedingungen gefärbt.

3.4.3 Tetramerfärbung

Um die Melan-A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen detektieren zu können, wurden 1×10^6 PBL, die aus den Milzen der NSG-Mäuse isoliert worden waren, mit HLA-A*0201-Melan-A_(ELA)-Tetramer (PE-konjugiertes HLA-A*0201-Melan-A_(ELA)-Tetramer, von D.Busch zur Verfügung gestellt) sowie Anti-CD8-Antikörpern gefärbt. Dafür wurden die PBL einmal mit FACS-Puffer (PBS + 1% FKS) gewaschen und anschließend in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe des Tetramers (1:25) wurden die Zellen für 25 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden Anti-CD8- und Anti-CD4-Antikörper (je 1:25) dazugegeben und für weitere 20 Minuten inkubiert. Nach insgesamt 45 Minuten wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit DAPI [60 ng/ml] für die lebend/tot-Färbung versetzt. Die FACS-Analyse erfolgte unmittelbar nach der Färbung am FACS-LSR II (BD).

3.4.4 CD137-Färbung auf reaktivierten CD8⁺ T-Zellen

Um Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen separieren zu können, wurde der Aktivierungs-induzierte Oberflächenmarker CD137 herangezogen. Dazu wurden $0,5 \times 10^6$ T-Zellen mit APZ im jeweils angegebenen Verhältnis in einer 24-Loch-Flachboden-Kulturplatte (Falcon, BD) bei 37°C/6,5% CO₂ in T-Zellmedium kokultiviert. Nach einer 12 – 16-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen gesammelt und wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben mit einem Anti-CD137-Antikörper (Allophycocyanin(APC)-konjugierter anti-human CD137-Antikörper, BD) gefärbt. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch am FACS LSR II (BD).

3.4.5 Sortierung CD137-positiver CD8⁺ T-Zellen

Die in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen CD137-gefärbten CD8⁺ T-Zellen wurden ebenfalls mit Fluoreszenz-konjugierten Anti-CD8-Antikörpern (PE-konjugiert, BD) gefärbt, um Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen anhand der Sortierungsmaschine FACS Aria III (BD, 100-µm-Düse) direkt in 96-Loch-Rundbodenplatten sortieren zu lassen. Hierfür wurden die Zellen nach der Färbung in 2 ml sterilem FACS-Puffer (steriles PBS + 1% steriles FKS) resuspendiert. Um tote Zellen ausschließen zu können, wurde der lebend/tot-Farbstoff DAPI [60 ng/ml] unmittelbar vor Sortierung dazugegeben. CD8-CD137-doppeltpositive T-Lymphozyten wurden in sterile 96-Loch-Rundbodenplatten mit vorgelegten 100 µl T-Zellmedium sortiert. Anschließend wurden pro Kavität 100 µl des Restimulationsgemisches (2×10^3 Zellen einer Mischung einzeln CrossTag-Antigen-ivt-mRNS-transfizierter mLCL, GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4, XAGE-1, bestrahlt mit 100 Gy, Bestrahlungsanlage ¹³⁷Cs, HWM-D-2000, Gammacell; 3×10^4 Zellen einer Mischung dreier unterschiedlicher Spender-PBL, bestrahlt mit 55 Gy; 250 ng/ml PHA oder 30 ng/ml Anti-CD3/-CD28; 20 U/ml IL-2 in T-Zell-Medium) dazugegeben. Die Kulturplatten wurden, um Temperaturschwankungen beim Öffnen des Brutschrankes zu minimieren, in Stahlboxen im Brutschrank bei 37°C/6,5% CO₂ inkubiert. Drei Tage nach Stimulation wurde das PHA vollständig entfernt und die Zellen mit frischem T-Zellmedium, 20U/ml IL-2 und 20 ng/ml IL-15 versehen. Nach 14 Tagen wurden die Zellen erneut, wie oben beschrieben, restimuliert. Die restlichen, nicht klonierten T-Lymphozyten wurden in CD8⁺ CD137⁺ und CD8⁺ CD137⁻ Fraktionen geteilt und separat mit 20 U/ml IL-2 und frischem T-Zellmedium in 24-Loch-Flachboden-Kulturplatten bei 37°C/6,5% CO₂ für weitere 14 Tage kultiviert.

3.5 Analyse verschiedener RNS-Spezies in Zellen

3.5.1 Isolierung zellulärer Gesamt-RNS

Für die Isolierung zelluläre Gesamt-RNS wurden bis zu 1×10^6 Zellen in 200 μ l TRI-Reagent® aufgenommen und homogenisiert. Dem Lysat wurde 1-Brom-3-Chlorproman im Verhältnis 5:1 hinzugefügt und kräftig gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 12 000 x g und 4°C zentrifugiert. Danach waren Proteine und RNS in unterschiedlichen Phasen getrennt. Die obere farblose RNS-Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt (1,5 ml Reaktionsgefäß von Eppendorf). Die RNS-Präzipitation erfolgte durch Isopropanol, das im Verhältnis 1:1 dazu gegeben wurde. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNS für 12 Minuten bei 12 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNS-Sediment für etwa 5 Minuten Luftgetrocknet, bevor es in 20 μ l RNase-freiem H₂O resuspendiert wurde. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch OD-Messung am UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, Peqlab) bei 260 nm.

3.5.2 Reverse Transkription von mRNS zu cDNS

Für die PCR-Analyse musste RNS zunächst in cDNS umgeschrieben werden. Dies wurde anhand des „1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ (Roche) unter Verwendung von olig-dT-Primern durchgeführt. Die RNS wurde für 10 Minuten auf 55°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Als Ausgangsmaterial wurde 1 μ g zelluläre Gesamt-RNS für die Umschreibung eingesetzt und nach Angaben des Herstellers mit den verschiedenen Reagenzien des Synthesekits gemischt. Die Synthese erfolgte in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß in einem Heizblock (10 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 99°C und zum Schluss 4°C). Die cDNS wurde auf -20°C gelagert.

3.5.3 PCR zur Analyse von TZR α -Sequenzen

Für die Analyse der V(D)J-Segmente sowie der CDR3-Sequenz einzelner TZR-Ketten wurde zelluläre Gesamt-RNS aus T-Zellklonen isoliert und in cDNS umgeschrieben. Mit Hilfe spezifischer Primer wurden über PCR die Sequenzen ermittelt (Steinle et al., 1995). Die in der V α -Kettensequenz bindenden 5'-Primer sowie die in der C-Region bindenden 3'-Primer (C α -Region: 3'T-C α)

sind in Tab. 3.3 aufgeführt. Die Amplifikatgröße der TZR α -Kette lag zwischen 370 und 500 Basenpaaren. Für die interne PCR-Kontrolle wurden zusätzlich 3'- und 5'-Primer verwendet, die beide in der konstanten C-Region der TZR banden (C α : 3'ST/5'ST; C α -Kontrollamplifikat: 550 bp). Als Negativkontrolle wurde in den sonst identischen PCR-Ansatz statt der Matrizen-cDNS H₂O in die Reaktion eingesetzt. Die PCR-Reaktionsbedingungen und Komponenten sind in Tab. 3.3 dargestellt. Nach Amplifikation der entsprechenden Ketten wurden die Produkte auf einem 1,0 %igen Agarosegel bei 125 V aufgetrennt. Die relevanten Banden wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Sequenzierung geschickt (Firma Sequiserve in Vaterstetten oder MWG in Ebersberg).

Tab. 3.3: Ansatz der TZR α -PCR und Reaktionsbedingungen

Reagenzien	Volumen	Reaktionsbedingungen			Zyklen
PCR Mastermix (Promega)	20 μ l	1. Denaturierung	95°C	5 Min.	1
5'ST	2,8 μ l (10 pmol/ μ l)	2. Denaturierung	95°C	30 Sek.	35
3'ST	2,8 μ l (10 pmol/ μ l)	3. Anlagerung	56°C	30 Sek.	
5'V α	6,0 μ l (5 pmol/ μ l)	4. Elongation	72°C	1 Min.	
3'TC α	4,0 μ l (5 pmol/ μ l)	5. Inaktivierung	72°C	10 Min.	1
cDNS	1-2 μ l	6. Kühlung	4°C	∞	1
H ₂ O (PCR-Grad)	ad. 40 μ l				

3.5.4 Analyse klonaler TZR β -Sequenzen mit Hilfe degenerierter Primer

Für die Analyse der TZR β -Kettensequenz einzelner T-Zellklone wurden zwei degenerierte Primerpaare verwendet, die 76% bzw. 20% der 55 V β -Gensegmente abdecken (Zhou, D. et al., 2006). Die TRBV14- und TRBV21-2-Gensegmente (IMGT-Nomenklatur) konnten mit diesen Primern nicht überprüft werden. Daher mussten separat zwei Reaktionen für die Analyse der TRBV14- und TRBV21-2-Segmente (IMGT-Nomenklatur) durchgeführt werden, sollte kein Amplifikat mit den degenerierten Primern erzielt worden sein. Als Negativkontrolle wurde in den sonst identischen PCR-Ansatz statt der Matrizen-cDNS H₂O (Negativkontrolle) in die Reaktion eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen sind in Tab. 3.4 aufgeführt. Nach Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf einem 1% igen Agarosegel bei 125 V aufgetrennt. Die relevanten Banden wurden aus dem Gel extrahiert und zum Sequenzieren geschickt (Firma Sequiserve in Vaterstetten oder MWG in Ebersberg).

Tab.3.4: Analyse der TZR β -PCR mittels degenerierter Primer

Reagenzien	Volumen	Reaktionsbedingungen	Zyklen
PCR Mastermix (Promega)	20 μ l	1. Denaturierung 95°C 5 Min.	1
5' VP1 oder VP2 Primer	8 μ l (10 pmol/ μ l)	2. Denaturierung 95°C 30 Sek.	40
3' CP1 Primer	0,8 μ l (10 pmol/ μ l)	3. Anlagerung 50°C 30 Sek.	
cDNS	1-2 μ l	4. Elongation 72°C 30 Sek.	
H ₂ O (PCR-Grad)	ad. 40 μ l	5. Inaktivierung 72°C 10 Min.	1
		6. Kühlung 4°C ∞	1

3.5.5 Expressionsanalyse von Tumor-Testis-Antigenen in unterschiedlichen Zelltypen mittels quantitativer *real-time* PCR

Da untersucht werden sollte, in welchen Zelltypen die sechs Tumor-Testis-Antigene (TTA) cTAGE 1, GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX4 und XAGE-1 exprimiert wurden, wurde die Gesamt-RNS verschiedener Zellen extrahiert, in cDNS umgeschrieben und die RNS-Menge pro Antigen quantitativ mittels qRT(quantitative *real-time*)-PCR analysiert. Dafür wurden Reagenzien des „LightCycler® 480 SYBR Green I Master-Kits“ verwendet. Parallel zu den Reaktionen zur Bestimmung der TTA-Transkriptmenge, wurde für jede eingesetzte cDNS-Matrize zur Überprüfung der eingesetzten DNS-Menge (interne Kontrolle) eine Reaktion mit α -Enolase-Primern durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde in den sonst identischen PCR-Ansatz statt der Matrizen-cDNS H₂O in die Reaktion eingesetzt. Die Reaktionen wurden im 96-Loch-Plattenformat vorbereitet und anschließend mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und die Platte für 2 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert. Das Reaktionsgemisch ist in Tab. 3.5 und die Reaktionsbedingungen in Tab. 3.6 aufgeführt. Zu dem angegebenen Reaktionsgemisch wurden jeweils 1 μ l cDNS hinzugefügt. Die stimulierten Zellen wurden entweder zwei oder vier Tage lang mit 75 μ g/ml PHA unspezifisch stimuliert bevor die RNS isoliert und in cDNS umgeschrieben wurde.

Tab. 3.5: Analyse der Expression verschiedener TTA in unterschiedlichen Zelltypen mittels spezifischer Antigen-Primer

	Mastermix TTA	Mastermix α -Enolase
H ₂ O	5 μ l	5 μ l
Sense Primer	2 μ l	2 μ l
Antisense Primer	2 μ l	2 μ l
Master Mix 2x	10 μ l	10 μ l
Pro Kavität	19 μ l	19 μ l

Tab. 3.6: Reaktionsbedingungen

Reaktionsbedingungen			Zyklen
1. Denaturierung	95°C	10 Min.	1
2. Denaturierung	95°C	10 Sek.	40
3. Anlagerung	60°C	20 Sek.	
4. Elongation	72°C	30 Sek.	
5. Schmelzkurve	95°C	5 Sek.	1
	65°C	1 Min.	
6. Kühlung	40°C	∞	1

Für die Auswertung wurden die jeweilige Schmelztemperatur pro Zielantigen analysiert (Schmelztemperatur und Basenpaarlänge der Amplifikate; siehe Tab. 3.7). Nach Normalisierung auf die CP-Werte der internen Kontrolle wurden die CP-Werte (lagen zwischen CP = 18 - 22) der Zielantigene in den jeweiligen Proben analysiert. Als Positivkontrolle für die Funktionalität der eingesetzten Primer wurde cDNS von der Melanomzelllinie Mel624.38 eingesetzt, die Transkriptmengen aller zu untersuchenden TTA aufwies.

Tab. 3.7: Amplifikation diverser TTA mittels quantitativer *Real-Time* PCR

Zielgen	Amplifikationsgröße [bp]	Schmelztemperatur [°C]
cTAGE-1	156	79,2
GAGE-1	321	87,4
MAGE-A4	342	86,1
NY-ESO-1	386	89,7
SSX4	363	84,1
XAGE-1	400	89,5
α-Enolase	619	88,4

Daneben wurde die erfolgreiche Transfektion von mDZ mit Antigen-ivt-mRNS auf Transkript-Ebene mittels qRT-PCR mit den angegebenen Primern untersucht. Auch hier wurde α-Enolase als interne Positivkontrolle verwendet. Die quantitative Berechnung wird im Folgenden anhand eines Beispiels verdeutlicht (Berechnung nach der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode):

Tab. 3.8: Rechenbeispiel zur Berechnung der x-fach vorliegenden Transkriptmenge in transfizierten mDZ im Vergleich zu nicht-transfizierten mDZ (CP-Werte für GAGE-1, Abb. 4.5 C)

	α -Enolase = Referenz (CP-Wert)	Zielantigen (CP-Wert)	Δ CP	$\Delta\Delta$ CP	Ratio (x-fach)
Formeln	-	-	CP(Zielantigen)- CP(α -Enolase)	Δ CP(Zielantigen)- Δ CP(α -Enolase)	$2^{(-\Delta\Delta CP)}$
untransfizierte mDZ	18,61	21,72	3,11		
Transfizierte mDZ	19,29	6,61	-12,68	-15,79	56658,3

3.6 In-vivo-Experiment: NOD/scid IL-2Rg^{null} (NSG) Mausmodell

3.6.1 Vakzinierung von NSG-Mäusen

NSG-Mäuse sind doppelt homozygot, zum einen für die Mutation, die die schwere kombinierte Immundefizienz (SCID) zur Folge hat, zum anderen für die Mutation im Allel für den IL-2-Rezeptor (IL-2R). Durch die Mutationen fehlen den Mäusen T- und B-Lymphozyten, sowie NKT-Zellen. Außerdem zeigte sich, dass die NK-Zellen ihre Funktionalität komplett einbüßten. Da die NK-Zellaktivität entscheidend für die Abstoßung von xenotransplantierten Zellen ist, eignet sich dieser Mausstamm besonders für die Rekonstitution mit humanen PBMZ (Ito et al., 2002). Wichtig ist die Haltung der Tiere unter möglichst sterilen Bedingungen, da sie aufgrund ihrer starken Immundefizienz sehr anfällig für Infektionen sind.

Um die Effizienz und den Einfluss des CrossTag-Konstruktes bei der De-Novo-Induktion von CD8⁺ T-Zellen in vivo zu untersuchen, wurde das von S. Spranger etablierte Protokoll adaptiert (Spranger et al., 2012). Mit humanen PBMZ rekonstituiert wurden 16 männliche NSG-Mäuse. Dafür wurde das Blut eines Spenders, wie in Abschnitt 3.1.9 beschrieben, aufgereinigt und 1×10^7 PBMZ in 200 μ l sterilem PBS (*low endotoxin*) pro Maus intravenös appliziert. Nach einem Zeitraum von zwei Wochen hatten sich die humanen PBMZ in den Mäusen etabliert. Aus frisch aufgereinigten Blutzellen wurden reife DZ generiert (siehe Abschnitt 3.1.10; Cocktail 5) und mit 48 μ g Melan-A-ivt-mRNS oder CrossTag-Melan-A-ivt-mRNS transfiziert (siehe Abschnitt 3.1.11). Nach der Elektroporation wurden die DZ fünf Stunden bei 37°C/6,5% in DZ-Medium (RPMI + 10% HS) inkubiert. Jeweils vier Mäuse wurden einer Versuchsgruppe zugeordnet. Gruppe eins wurde nicht mit DZ vakziniert, Gruppe zwei wurde zweimal mit Melan-A-ivt-mRNS transfizierten DZ, Gruppe drei mit CrossTag-Melan-A-ivt-mRNS transfizierten DZ und Gruppe vier mit einer 1:1 Mischung aus DZ der Gruppe zwei und drei vakziniert. Jede zu vakzinierende Maus erhielt intravenös 1×10^6 DZ in 200 μ l sterilem PBS (*low endotoxin*). Nach einer weiteren Woche wurden

die Mäuse mit wiederum frisch präparierten, transfizierten DZ identisch zur ersten Vakzinierung ein zweites Mal vakziniert. Nach weiteren sieben Tagen wurden die Mäuse getötet (Tötung durch Inhalation von CO₂). Milzzellen wurden isoliert und *in vitro* weiter kultiviert.

3.6.2 Post-mortem-Untersuchung und -Präparation von Milzzellen

Nach Tötung der Mäuse wurde ein Y-Schnitt gesetzt und der Bauchraum geöffnet, um Leber und Milz auf Veränderungen untersuchen zu können. Die Milz wurde herauspräpariert, durch einen Zellfilter gedrückt und mit 5 ml RPMI (*low endotoxin*) gemischt. Zur Homogenisierung und Vereinzelung der Zellen wurde die Suspension mehrmals mit einer 10 ml Spritze aufgenommen und dann die Spritze durch Aufsetzen auf den Boden einer Petrischale wieder entleert.

3.6.3 Kultivierung der Milzzellen

Für die Tetrameranalyse wurden $0,5 \times 10^6$ Milzzellen (HLA-A*0201-Melan-A_(ELA)-Tetramer-PE) und $0,2 \times 10^6$ Milzzellen für die Panelanalyse (CD8, CD4, CD56, CD19, CD25, CD137, CD69) verwendet. Dreiviertel der Milzzellen wurden ohne sie zu fikollieren in 20 ml T-Zellmedium mit 50 U/ml IL-2 aufgenommen, in eine 80 cm²-Nunclon™ Δ Surface-Zellkulturflasche (Thermo Scientific) transferiert und bei 37°C/6,5% CO₂ inkubiert. Die restlichen Milzzellen der Gruppen zwei, drei und vier wurden spezifisch mit transfizierten DZ entsprechend der Vakzinierung restimuliert. Zwei Tage später wurde die Kokultur mit 20 U/ml IL-2 versehen. Vier Tage nach Beginn der Kultivierung waren die Milzzellen, die nur unspezifisch mit IL-2 stimuliert worden waren, so stark proliferiert, dass die Hälfte eingefroren wurde (siehe Abschnitt 3.1.2). Die DZ-stimulierten Milzzellen wurden an Tag 10 nach der Restimulation *in vitro* für die Tetramerfärbung (HLA-A*0201-Melan-A_(ELA)-Tetramer-PE) verwendet, an Tag 11 für die Analyse auf spezifische Melan-A-Reaktivität im ELISpot eingesetzt und die restlichen Zellen an Tag 14 eingefroren (siehe Abschnitt 3.1.2).

3.6.4 Abbruchkriterien für das NSG-Mausexperiment

Um den Versuchstieren nicht unzumutbare Schmerzen oder Leidensphasen zuzufügen, wurden Abbruchkriterien festgelegt, unter denen das Experiment sofort beendet werden und die Mäuse euthanasiert werden mussten. Die Kriterien für einen solchen Fall waren:

- Abdomenschwellung
- tastbarer Tumor im Bauchraum
- Kurzatmigkeit
- subkutaner Tumor
- Apathie oder Vitalitätsverlust
- gekrümmter Rücken
- struppiges Fell
- Absonderung von der Gruppe

Zur Überwachung des Zustandes der Tiere wurden diese täglich gesichtet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Etablierung einer Methode zur De-novo-Induktion Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Aus tumortherapeutischer Sicht ist der adoptive Transfer Tumor-reaktiver T-Zellen eine viel versprechende Strategie zur spezifischen Bekämpfung entarteter Zellen. Dabei ist es essentiell, die T-Zellen mit einem TZR auszustatten, der zum einen ein auf Tumoren beschränktes Antigen erkennt und zum anderen dies mit einer hohen Affinität bewerkstelligen kann. Andernfalls käme es zu unerwünschten Nebeneffekten, wie der Zerstörung von Normalgewebe oder zur unzureichenden Tumoreliminierung. Daher war das Ziel dieser Arbeit, eine effektive Methode zu etablieren, mit deren Hilfe Tumor-Antigen-reaktive CD8⁺ T-Zellen induziert und isoliert werden können. Folgende Abschnitte beschreiben die Entwicklung eines in vitro De-novo-Induktionsansatzes, sowie die Etablierung eines geeigneten Systems zur weiteren Charakterisierung Tumor-Antigen-spezifischer TZR, welche transient in Rezipientenzellen eingebracht wurden.

4.1.1 Prinzip der De-novo-Induktion von Tumor-Testis-Antigen (TTA)-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Der Umstand der negativen Selektion von Selbst-Peptid:Selbst-MHC-erkennenden T-Zellen im Thymus zur Vermeidung von Autoreaktivität, verhindert die Generierung hoch-avider Tumor-reaktiver CD8⁺ T-Zellen, da Tumorantigene oft Selbst-Antigene darstellen. Um das Repertoire an hoch-affinen TZR abrufen zu können, ist es notwendig, die Tumorantigene in einen fremden MHC-Kontext zu stellen. Dies wurde bewerkstelligt, indem T-Lymphozyten und DZ von verschiedenen Spendern eingesetzt wurden, die sich in fast allen MHC-I-Allelen unterschieden. Auf diese Weise wurden Tumorantigene im für die T-Lymphozyten allogenen MHC-Klasse-I-Kontext präsentiert. Da es sich um mehrere allogene MHC-I-Allele handelte, wurde der Begriff „multi-allogen“ eingeführt (Abb. 4.1 A).

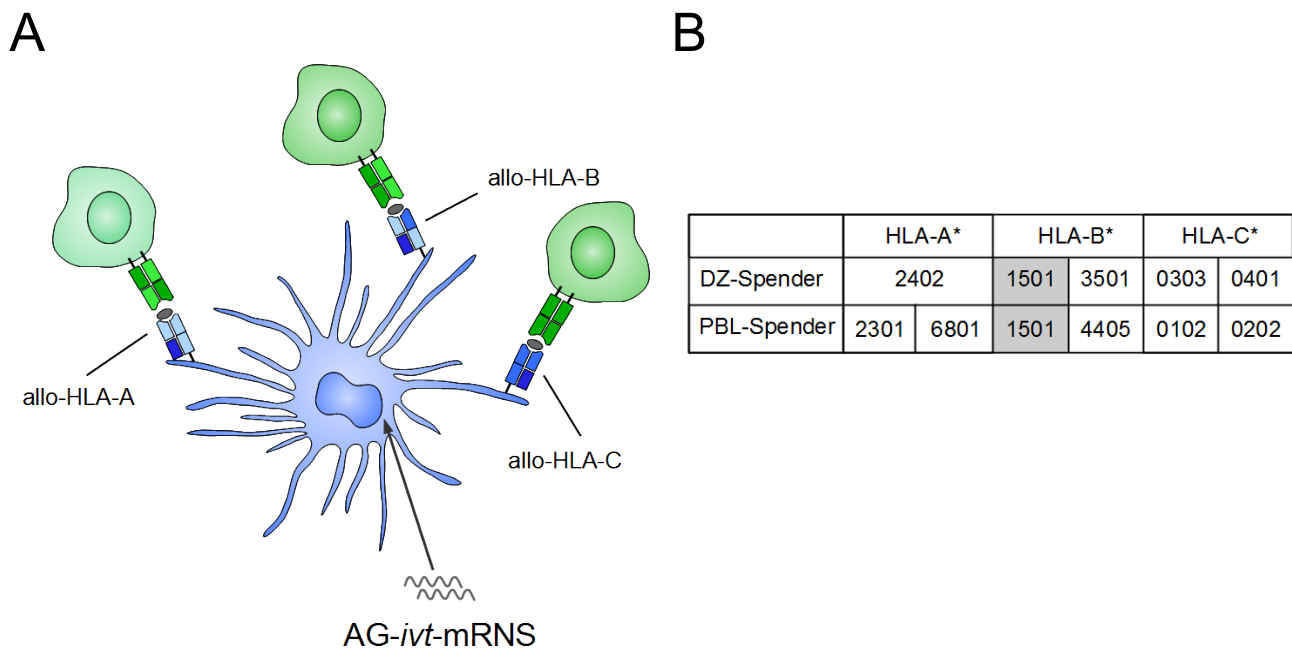


Abb. 4.1: De-novo-Induktion von TTA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im multi-allogenen Ansatz

(A) Um hoch-affine HLA-Klasse-I-restringierte, TTA-spezifische TZR zu erhalten, wurden PBL eines Spenders (grün; MP) mit Antigen(AG)-ivt-mRNS-transfizierten mDZ eines zweiten Spenders (blau; SJ) kokultiviert. (B) Die Spender stimmten nur in einem HLA-Klasse-I-Allel (HLA-B*1501, grau in der Tabelle unterlegt) überein, wodurch die TTA auf für die PBL vier fremden HLA-Klasse-I-Molekülen präsentiert wurde (sog. multi-allogene De-novo-Induktionsansatz).

DZ wurden mit ivt-mRNS transfiziert, die für Tumorantigene codierte. Auf diese Weise wurde das ganze Tumorantigen von den Zellen prozessiert. Durch die Transfektion maturer DZ (mDZ) mit ivt-mRNS, codierend für verschiedene Tumorantigene, werden die T-Lymphozyten einer natürlichen Selektion für die immunogensten Epitope unterworfen.

Die Berichte, dass die Anwesenheit von CD4⁺ T-Zellen für das Überleben und die Expansion von CD8⁺ T-Zellen sowohl bei Antigen-Erstkontakt als auch für die Bildung und Aktivierung von Gedächtnis-CD8⁺ T-Zellen essentiell ist, häufen sich zunehmend. Dabei wird immer klarer, dass die Hilfe, die die CD8⁺ T-Zellen von den CD4⁺ T-Zellen erhalten, sehr vielschichtig sein kann. Das kann zum einen das unterstützende Zytokinmilieu durch die T-Helferzellen sein, bzw. sezerniertes IL-12, das von den DZ als Antwort auf die Interaktion mit CD4⁺ T-Zellen produziert wird. Zum anderen führt die Bindung der CD4⁺ T-Zellen an DZ zur Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle, wie CD80 und CD86, die für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen wichtig sind (Wiesel und Oxenius, 2012). Um diese unterstützende Wirkung auch in vitro zu ermöglichen, wurden PBL und nicht CD8⁺-angereicherte T-Zellen mit mDZ induziert. Für die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen, wurden mDZ mit ivt-mRNS, codierend für Tumorantigene, transfiziert, die am N-terminalen Ende an die humane Signalsequenz LAMP-1 und am C-terminalen Ende an das humane DC-LAMP

gekoppelt wurden (im Folgenden als CrossTAG-Antigen-ivt-mRNS bezeichnet). Diese Signalsequenzen führen dazu, dass das translatierte Protein vom endoplasmatischen Retikulum (ER) vesikulär in das endosomale und lysosomale Kompartiment MHC transportiert wird, wo es auf MHC-II-Moleküle geladen wird. So werden endogen synthetisierte und prozessierte Peptide nicht nur über den klassischen Weg auf MHC-I, sondern auch auf MHC-II geladen. Diese Kreuzpräsentation ermöglicht eine Aktivierung von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen mittels der oben beschriebenen transfizierten mDZ. Die Funktionalität dieses Ansatzes und eine erfolgreiche Induktion von CD4⁺ T-Helfer- und CD8⁺ Effektor-T-Zellen wurde mit murinen LAMP-1 und humanem DC-LAMP gezeigt (Van Nuffel et al., 2012b). Vor kurzem konnte in unserer Arbeitsgruppe von Christian Ellinger nachgewiesen werden, dass mittels humaner Signalsequenzen ebenfalls die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erreicht werden kann (Ellinger, 2013).

4.1.2 Wahl der Zielantigene

Vor Beginn der De-novo-Induktion stellte sich die Frage, welche Tumor-assoziierten Antigene am geeignetsten für die Generierung einer spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort sein könnten. Für die Sicherheit der Patienten und eine gezielte Zerstörung von möglichst nur Tumorzellen ist es zwingend erforderlich, Zielantigene zu wählen, die von Normalgewebe bzw. -zellen nicht oder nur sehr gering exprimiert werden. Tumor-Testis-Antigene (TTA) sind als Tumor-assoziiert und ansonsten nur in immunprivilegierten Geweben vorkommende Antigene beschrieben. Daher wurden einige aus dieser Antigen-Gruppe herausgegriffen und die Expression in verschiedenen Zelltypen auf RNS-Ebene anhand der quantitativen *Real-Time* PCR untersucht, um so geeignete Kandidaten identifizieren zu können.

Geeignete Primer und PCR-Bedingungen für die spezifische Amplifikation von cTAGE-1, GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX4 und XAGE-1 wurden anhand der Melanomzelllinie Mel624.38, die Transkripte für alle genannten Antigene aufwies, ausgetestet. Die zu erwartende Amplifikatgröße sowie die Schmelztemperatur für die ausgewählten Antigene sind in Tab. 3.7 aufgeführt.

Wie in Abb. 4.1 ersichtlich, konnte mit geeigneten Primerpaaren jeweils ein spezifisches Produkt amplifiziert werden. Die Sequenzanalyse der ausgeschnittenen und aufgereinigten Banden bestätigte die Identität der entsprechenden Zielantigene. Im Falle der MAGE-A4-Primer konnte man sogar die Isoform von anderen Mitgliedern aus der gleichnamigen Familie unterscheiden. Als interne Kontrolle jedes PCR-Ansatzes wurde das Haushaltsgen α -Enolase gewählt.

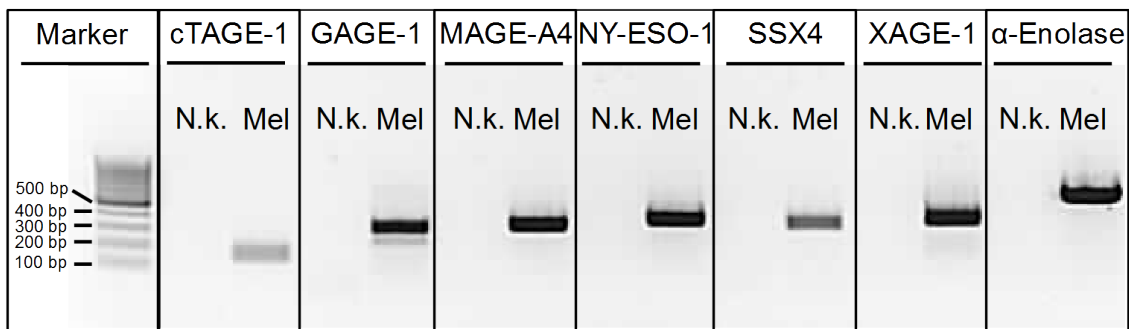


Abb. 4.1: Nachweis der Transkripte ausgewiesener Tumor-Testis-Antigene

Verschiedene TTA wurden anhand von spezifischen Primern in der *Real-Time* PCR aus cDNS der Melanomzelllinie Mel624.38 (Mel) amplifiziert und anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die Negativkontrolle (N.k.) wurde für den Ausschluss einer Kontamination der Primer mitgeführt. Die Sequenzierung der Gelbanden bestätigte die Identität der angegebenen Zielantigene.

Um die Eignung der zu untersuchenden TTA als Zielantigene für die Tumorthherapie einschätzen zu können, wurden verschiedene Zelltypen auf transkriptioneller Ebene untersucht. Dabei wurde cDNS von PBMZ, CD8⁻, CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellklonen in unterschiedlichen Aktivierungsstadien für die PCR-Analyse verwendet. Als unstimuliert wurden diejenigen Zellen bezeichnet, die sich in einer ruhenden Phase, 14 Tage nach der letzten Restimulation, befanden. Stimuliert wurden die Zellen unspezifisch mit Phytohämagglutinin (PHA) und RNS zwei oder vier Tage danach für die quantitative RT-PCR-Analyse präpariert. Des Weiteren wurden DZ untersucht. Hierfür wurden immature DZ (iDZ) mit unterschiedlichen Maturierungscocktails zu muren DZ (mDZ) ausgereift (Cocktail 5, 6 oder Jonuleit; siehe Abschnitt 3.1.10), oder iDZ direkt analysiert. Für die Identifizierung TTA-spezifischer T-Zellen auf klonaler Ebene wurden Mini-LCL (mLCL) oder LCL eingesetzt. Daher war es ebenfalls essentiell, dass diese Zellen die entsprechenden Antigene nicht endogen exprimierten, um zu vermeiden, dass potentiell TTA-spezifische T-Zellen aufgrund ihrer Reaktivität gegen die APZ aussortiert wurden. Die Amplifikate wurden auf 1 %ige Agarosegele aufgetragen und dokumentiert. Einige Banden von erwarteter Amplifikat-Länge wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Überprüfung der spezifischen Nukleotidabfolge zum Sequenzieren eingeschickt (in Abb. 4.2 mit einem „*“ markiert). Handelte es sich bei der Sequenz um das gesuchte Zielantigen, so wurde dies mit einem Plus (+) kenntlich gemacht. Unspezifisch amplifizierte Produkte sind mit einem Minus (-) markiert (Abb. 4.2). Alle restlichen Amplifikate wurden anhand der spezifischen Schmelztemperaturen für jedes Antigen überprüft. Das Auftreten unspezifischer Banden ist mit der relativ hohen Zyklenzahl (40 Zyklen) zu erklären, die gewählt wurde, um auch geringe Transkriptmengen der Antigene nachweisen zu können.

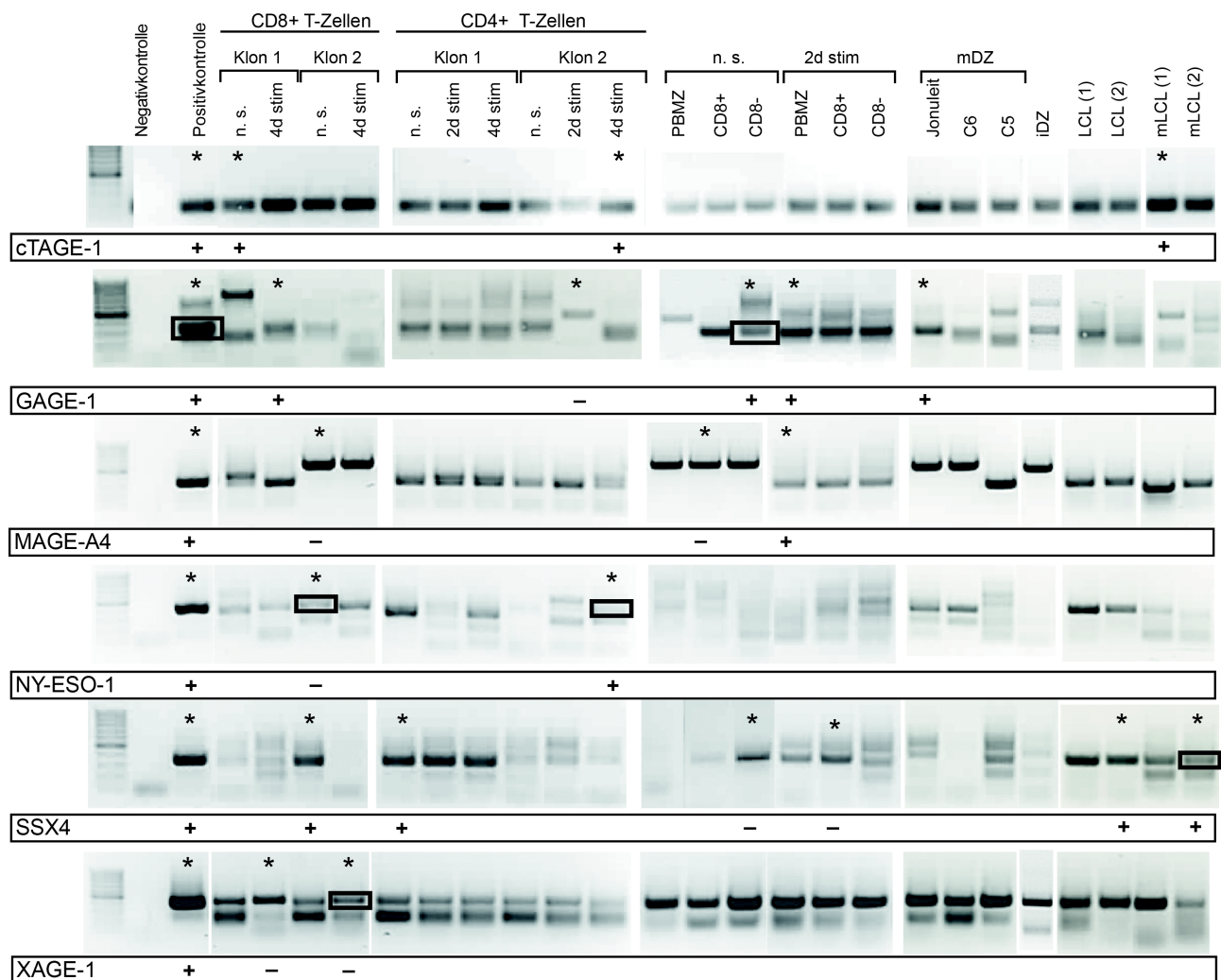


Abb. 4.2: Amplifikation von TTA in verschiedenen Zelltypen

Mit spezifischen Primern wurde in verschiedenen Zelltypen (PBMZ, CD8-, CD8+, CD4+, mLCL, LCL und DZ) auf cTAGE-1-, GAGE-1-, MAGE-A4-, NY-ESO-1-, SSX4- und XAGE-1-Transkripte hin untersucht. Sequenzierte Gelbanden (*) wurden mit der Sequenz des jeweiligen Zielantigens verglichen und hinsichtlich der Übereinstimmung (+) oder Unterschiedlichkeit (-) markiert. Als Positivkontrolle wurde cDNS der Melanomzelllinie Mel624.38 eingesetzt. Kontaminationen in verschiedenen Komponenten des PCR-Ansatzes mit cDNS wurde mit einer Negativkontrolle ausgeschlossen. Nicht stimuliert (n.s.); RNS-Extraktion zwei/vier Tage nach PHA-Stimulation (2d stim./4d stim.). Die Analyse wurde insgesamt zweimal durchgeführt.

Eine Zusammenfassung der Transkriptanalyse in den verschiedenen Zelltypen ist in Tab. 4.2 dargestellt. Es zeigte sich, dass cTAGE-1 in allen untersuchten Proben nachweisbar war, wodurch es als Kandidaten-Antigen für die De-novo-Induktion von spezifischen TZR nicht in Frage kam. Die restlichen Antigene zeigten generell nur in einigen Zelltypen geringe Transkriptmengen (CP-Werte lagen meist zwischen 26 und 30). Im Falle von XAGE-1 konnte in den untersuchten Proben keine spezifische mRNS, außer in geringen Mengen in mit dem Jonuleit-Cocktail maturierten DZ, nachgewiesen werden. Die unspezifisch amplifizierten Produkte wurden z.T. durch Sequenzierung bzw. durch Vergleich der Schmelztemperatur der Amplifikate mit der Positivkontrolle analysiert.

Durch das restringierte Vorkommen der XAGE-1-mRNS eignete sich dieses Antigen besonders als TTA-Kandidat für die Generierung spezifischer CD8⁺ T-Zellen. MAGE-A4, SSX4 und NY-ESO-1 wurden nur in geringem Umfang in einigen Zelltypen detektiert. MAGE-A4 konnte hauptsächlich in aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden. NY-ESO-1 wurde v.a. in CD4⁺ T-Zellen, in DZ und in LCL exprimiert. Neben cTAGE-1 wurde auch GAGE-1 ubiquitär in den untersuchten Linien detektiert. Abgesehen von den meisten DZ, einigen mLCL und T-Zellen waren GAGE-1-Transkripte überall vertreten, wenn auch in geringem Umfang (○, CP-Werte zwischen 28-31). Trotz ausreichend eingesetzter cDNS-Menge (α-Enolase-CP-Werte lagen zwischen 18 und 22) lagen die CP-Werte für die Antigene meist zwischen 25-31. Aus diesem Grund wurden für die De-novo-Induktion von TTA-spezifischen T-Zellen die Antigene GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX4 und XAGE-1 ausgewählt. cTAGE-1 wurde aufgrund des universellen Vorkommens in den untersuchten Linien ausgeschlossen.

Tab. 4.2: Zusammenfassung der Transkriptanalyse ausgewählter Zielantigene in verschiedenen Zelltypen
Keine Detektion der Antigentranskripte (-), sehr geringe Transkriptmengen (○), CP-Werte zwischen 28-31) bzw. moderate Transkriptmengen (+, CP-Werte <28) wurden markiert. cDNS der Melanomzelllinie Mel624.38 fungierte als Positivkontrolle. Die CP-Werte wurden anhand des Haushaltsgens α-Enolase für jede Probe normalisiert.

	CD8+ T-Zellklone							CD4+ T-Zellklone							Spender 1					Spender 2					DZ				LCL			mLCL						
	unstim. (Klon1)	4d PHA(Klon1)	unstim.(Klon2)	4d PHA (Klon2)	unstim.(Klon3)	2d PHA (Klon3)	4d PHA (Klon3)	unstim. (Klon1)	2d PHA (Klon1)	4d PHA (Klon1)	unstim. (Klon2)	2d PHA (Klon2)	4d PHA (Klon2)	unstim. (Klon3)	2d PHA (Klon3)	4d PHA (Klon3)	PBMZ	CD8+	CD8-	PBMZ stim.	CD8+ stim.	CD8- stim.	PBMZ	CD8+	CD8-	PBMZ stim.	CD8+ stim.	CD8- stim.	Jonuleit	Cocktail 6	Cocktail 5	!DZ	#1	#5	MSC	MRE	SJ	ME
cTAGE-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAGE-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAGE-A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NY-ESO-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SSX4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XAGE-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.1.3 Sortierung von aktivierten Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Eine gängige Vorgehensweise zur Isolierung von Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ist die Sortierung mittels MHC-Tetrameren. Nachteilig daran ist zum einen, dass man damit nur diejenigen T-Zellen separieren kann, die das eingesetzte Peptid erkennen und zum anderen die HLA-Restriktion von dem verwendeten Tetramer vorgegeben wird. Die restlichen T-Zellen, die andere Epitope erkennen oder eine andere HLA-Restriktion haben, fallen hierbei durch das Selektionsraster. Eine Alternative zur Tetramersortierung stellt das Oberflächenmolekül CD137 (4-1BB) dar, das nach spezifischer Aktivierung über den TZR von CD8⁺ T-Zellen hochreguliert wird (Wolfl et al., 2007). Um zu erfahren, unter welchen Bedingungen und in welcher Zeitspanne die Präsentation dieses Moleküls auf der T-Zelloberfläche ihr Maximum erreicht hat, wurde der etablierte, HLA-A2*0201-restringierte, Tyrosinase-spezifische CD8⁺ T-Zellklon IVS-B in unterschiedlichen Verhältnissen mit seinen Zielzellen kokultiviert und in regelmäßigen zeitlichen Abständen die CD137-Expression durchflusszytometrisch gemessen. Als Zielzellen wurde die Melanomzelllinie Mel624.38 (HLA-A2*0201-positiv, Tyrosinase-positiv) eingesetzt, als Negativkontrolle fungierte die Melanomzelllinie Mela375 (HLA-A*0201-positiv, Tyrosinase-negativ), die den Klon nicht stimulieren sollte. Der IVSB-Klon befand sich vor Beginn der Testreihe im ruhenden Zustand (14 Tage nach letzter Restimulation). Der prozentuale Anteil an CD8-, CD137-doppelt-positiven T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn der Kokultur mit den Stimulatorzellen ist in Abb. 4.3 A ersichtlich. Wurden die T-Zellen mit ihren Zielzellen im Verhältnis 1:1 kokultiviert, erreichte die CD137-Expression nach 12 Stunden ihr Maximum, als 87% der T-Zellen das Molekül auf der Zelloberfläche exprimierten. Wurden weniger Zielzellen (1:10, 1:20, 1:40 und 1:100) eingesetzt, wurde die maximale Expression auf den T-Zellen bereits nach acht Stunden erreicht, wobei sich bis zum 12-Stunden-Wert der Anteil an CD137-positiven CD8⁺ T-Zelle kaum veränderte. Die Kokultivierung mit Mela375 führte über den gesamten Beobachtungszeitraum zu keiner Hochregulierung des kostimulatorischen CD137-Moleküls (Abb. 4.3 A). Neben der CD137-Expression wurde das Expressionsniveau von CD8- und CD3-Molekülen auf der Zelloberfläche nach Stimulation untersucht. Vor Stimulation zeigten alle IVSB-Zellen eine hohe mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD8-Molekülen pro Zelle auf der Oberfläche (MFI = 51280). Nach Stimulation der Zellen im Verhältnis 1:1 sank die MFI bereits nach acht Stunden auf ca. die Hälfte (MFI = 23419) und nach 23 Stunden auf 40% des Anfangswertes (Abb. 4.3 B). Wurden die T-Zellen mit einer geringeren Anzahl an Zielzellen stimuliert, fiel dieser Effekt z.T. weniger deutlich aus. Wie auch schon bei CD8, wurde die MFI von CD3 bestimmt. CD3 steht repräsentativ für die Menge an exponierten TZR, da TZR ohne CD3 nicht an die Oberfläche der T-Zellen transportiert werden können. Die Stimulation mit Zielzellen im Verhältnis 1:1 führte zu einer Hochregulierung von CD3 über den gesamten Zeitraum hinweg, wobei das Maximum (2,6-fache Steigerung im Vergleich zum Ausgangswert vor der Stimulation) mit dem Maximum der CD137-Expression nach

12 Stunden korrelierte. Die Stimulation im Verhältnis 1:10 und 1:20 führte ebenfalls zu einer leichten Hochregulierung von CD3 innerhalb der ersten 14 Stunden, gefolgt von einem Abfall auf etwa den Ausgangswert. Das Verhältnis von 1:40 oder 1:100 verdünnte Mel624.38 resultierte in einer tendenziell geringeren MFI (Abb. 4.3 C).

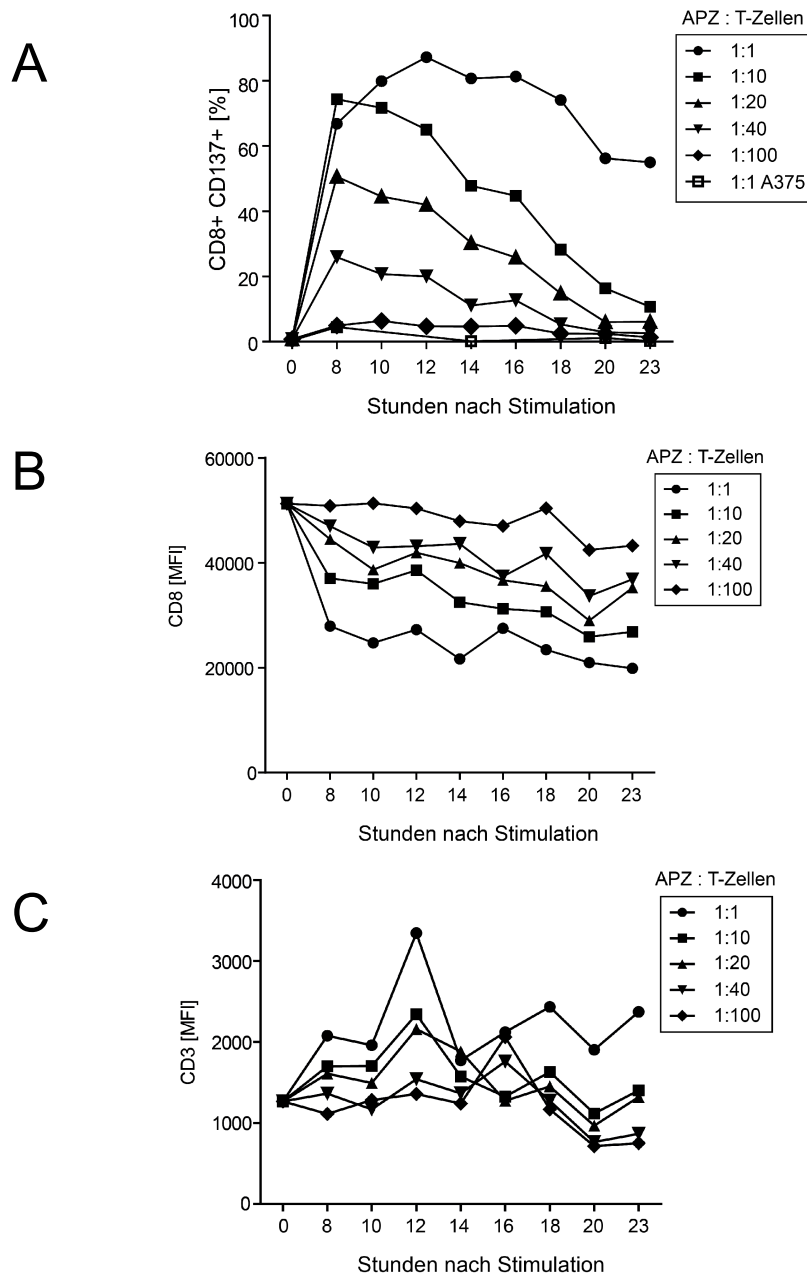


Abb. 4.3: Analyse der CD137-, CD8- und CD3-Expressionskinetik auf der Oberfläche von CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation

Der HLA-A*0201-restringierte, Tyrosinase-spezifische CD8⁺-T-Zellklon IVSB wurde mit der Melanomzelllinie Mel624.38 (HLA-A*0201, Tyrosinase-positiv) oder MelA375 (HLA-A*0201, Tyrosinase-negativ) kokultiviert. Dabei wurden die Zielzellen mit jeweils 1×10^6 T-Zellen in den Verhältnissen 1:1, 1:10, 1:20, 1:40 oder 1:100 inkubiert. Die Expression der Oberflächenmoleküle CD137, CD8 und CD3 wurde über einen Zeitraum von 23 Stunden hinweg untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten, monoklonalen Antikörpern gefärbt und quantitativ im Durchflusszytometer analysiert. In den Graphen sind **(A)** der prozentuale Anteil der CD8-, CD137-doppelt-positiven T-Zellen bzw. die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von **(B)** CD8 oder **(C)** CD3 auf der Oberfläche der T-Zellen angegeben. Die Zellpopulationen wurden auf lebende Lymphozyten vorselektiert.

4.1.4 De-novo-Induktion von TTA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mittels CrossTag-ivt-mRNS

4.1.4.1 Zeitliche Übersicht der T-Zell-De-novo-Induktion

Im Folgenden wird beschrieben, wie TTA-spezifische CD8⁺ T-Zellen in vitro generiert wurden. Dazu wurden iDZ aus Monozyten innerhalb von drei Tagen mit dem Cocktail 6 ausmaturiert und anschließend mit jeweils 20 µg der fünf TTA-codierenden CrossTag-ivt-mRNS (für GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX4 und XAGE-1) transfiziert. Die mDZ-Population wurde hierzu in fünf Aliquots aufgeteilt und jede Fraktion mit einer der fünf CrossTag-ivt-mRNS-Spezies via Elektroporation transfiziert (Abb. 4.4 A). Nach Transfektion wurden die mDZ für sechs Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend die Fraktionen zu gleichen Teilen gemischt. PBL wurden mit allogenen mDZ im Verhältnis 4:1 kokultiviert. Als Kontrolle wurden mDZ Kontroll-elektroporiert und separat mit PBL kokultiviert. Die verbliebenen transfizierten mDZ wurden für spätere Restimulationen oder weitere Analysen eingefroren. Die Restimulation erfolgte 14 Tage nach der De-novo-Induktion und nach weiteren 12 Stunden die Sortierung CD137-positiver CD8⁺ T-Zellen in 96-Loch-Rundbodenplatten. Es wurden eine, drei oder sechs Zellen pro Kavität sortiert und die Zellen sofort danach mit bestrahlten PBL und allogenen mLCL, die alle fünf TTA exprimierten, sowie mit PHA oder Anti-CD3/CD28-Antikörpern, IL-2 und IL-15 stimuliert. Die Antigenspezifität der expandierten T-Zellen erfolgte 14-28 Tage nach Sortierung (Abb. 4.4 B).

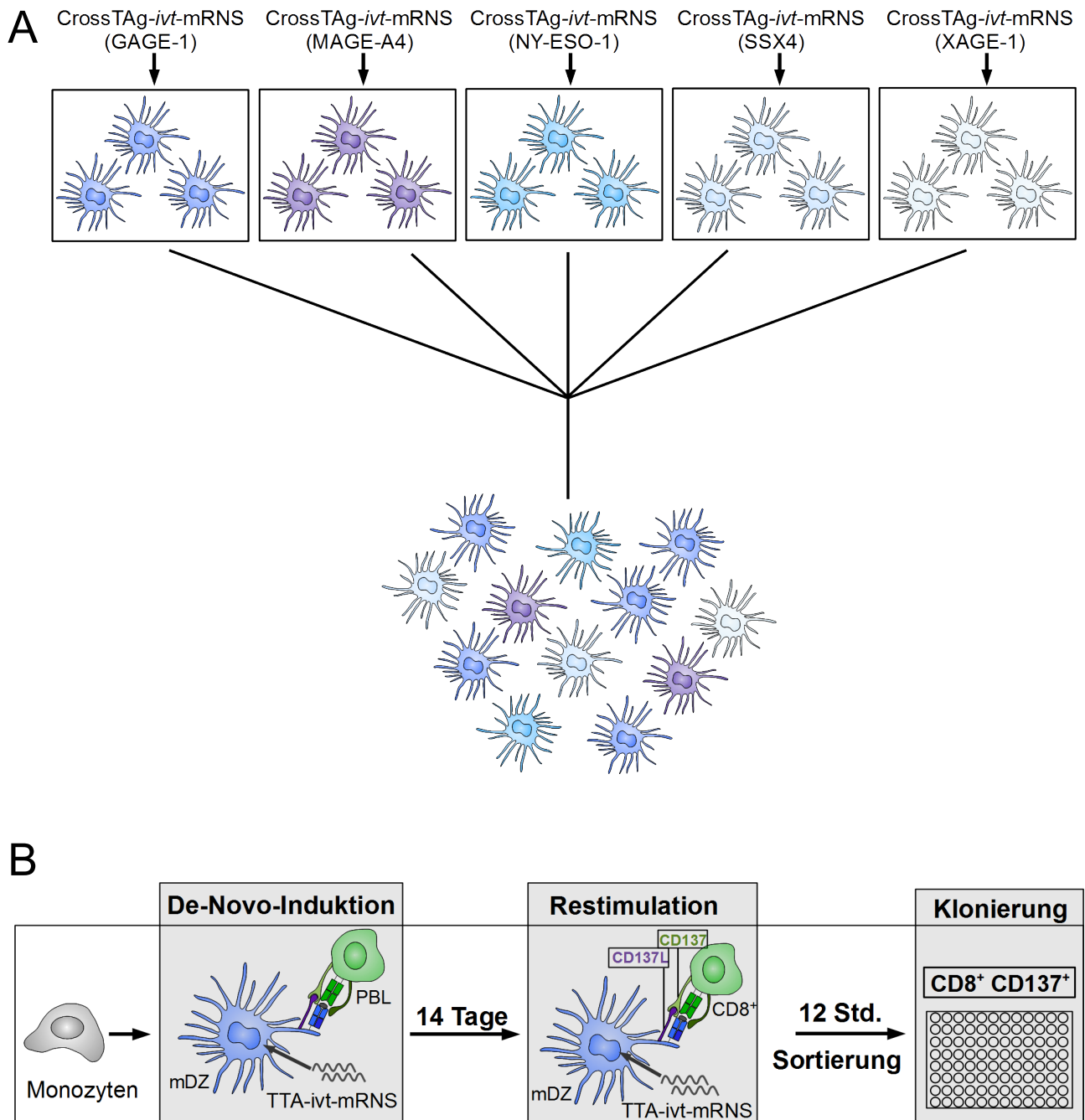
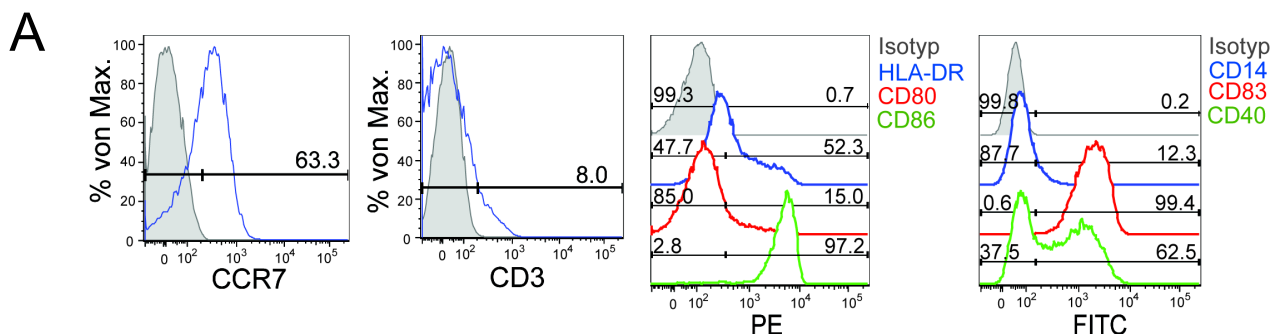


Abb. 4.4: De-Novo-Induktion von TTA-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten

Aus Vollblut isolierte Monozyten wurden innerhalb von drei Tagen mit Cocktail 6 zu reifen DZ (mDZ) ausmaturiert. **(A)** Für die Transfektion der mDZ mit TTA wurden diese in fünf Fraktionen aufgeteilt und jede Fraktion mit einer CrossTAG-TTA-*ivt*-mRNS-Spezies (für GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX4 oder XAGE-1) elektroporiert. Nach sechsständiger Inkubation bei 37°C wurden die DZ-Aliquots wieder zu gleichen Teilen gemischt (5-TTA) und **(B)** Monozyten-depletierte PBL de novo induziert. Nach 14 Tagen erfolgte die Restimulation der PBL mit CrossTAG-5-TTA-*ivt*-mRNS-transfizierten mDZ (Restimulation). PBL wurden 12 Stunden später mit CD8- und CD137-Antikörpern gefärbt und spezifisch aktivierte CD8⁺ T-Lymphozyten anhand des Aktivierungs-induzierten Oberflächenmarkers CD137 mit der FACS-Aria-Sortiermaschine in eine 96-Loch-Rundbodenplatte sortiert. Es wurden eine, drei oder sechs Zellen pro Kavität kloniert und mit PHA oder mit Anti-CD3/CD28-Antikörpern, IL-2, IL-15, 2×10^3 CrossTAG-5-TTA-*ivt*-mRNS-transfizierten bestrahlten allogenen mLCL und 3×10^4 bestrahlten PBL (gemischt aus vier verschiedenen Spendern) restimuliert.

4.1.4.2 Analyse der Ausgangs-Zellpopulationen

Monozyten wurden mit Hilfe der Plastikadhärenz von den restlichen PBL separiert und innerhalb von drei Tagen mit dem Maturierungscocktail (C6) zu mDZ ausdifferenziert. Zur Überprüfung der Stimulationsfähigkeit der mDZ wurden wichtige Oberflächenmarker durchflusszytometrisch überprüft (Abb. 4.5 A). Die Fähigkeit der mDZ, T-Zellen zu aktivieren zeichnet sich durch die Anwesenheit von kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 und CD40 aus. CD86 und CD40 waren erwartungsgemäß auf dem Großteil der mDZ hoch exprimiert. Besonders CD86 wurde von über 90% der DZ stark exprimiert. Andererseits war CD80 nur auf einem geringen Prozentsatz der Zellen zu finden. HLA-DR, repräsentativ für HLA-Klasse-II-Moleküle, und CD83 waren ebenfalls moderat bis hoch exprimiert. Des Weiteren konnte eine gute Expression des Chemokinrezeptors CCR7 nachgewiesen werden. Dementsprechend war der Prozentsatz an CD14-positiven Zellen, der die Monozytenpopulation bzw. unreife DZ (iDZ) widerspiegelt, gering. Die Reinheit der mDZ wurde anhand des T-Lymphozytenmarkers CD3 überprüft (ca. 8% CD3⁺ T-Zellen) und war als hoch einzuschätzen. Zur Kontrolle der Antigenexpression wurde ein Teil der mDZ mit GFP-ivt-mRNS transfiziert. Sechs Stunden nach der Elektroporation exprimierten bereits 69,8 % der Zellen das grün-fluoreszierende Protein und zeugten damit von einer erfolgreichen Transfektion. Dies wurde durch die quantitative Analyse auf RNS-Ebene in den CrossTAG-5-TTA-ivt-RNS-transfizierten mDZ im Vergleich zu nicht elektroporierten mDZ bestätigt. Als Referenz fungierten untransfizierte mDZ, deren CP-Werte den Ausgangswert darstellten und mit denen die Transkriptmengen der transfizierten mDZ verglichen wurden. Es konnte eine deutlich höhere Transkriptmenge an GAGE-1 (3,5 x 10⁴-fach), MAGE-A4 (4,7 x 10⁴-fach), SSX4 (7,3 x 10⁴-fach) und XAGE-1 (16 x 10⁴-fach) als in den Referenzzellen festgestellt werden.



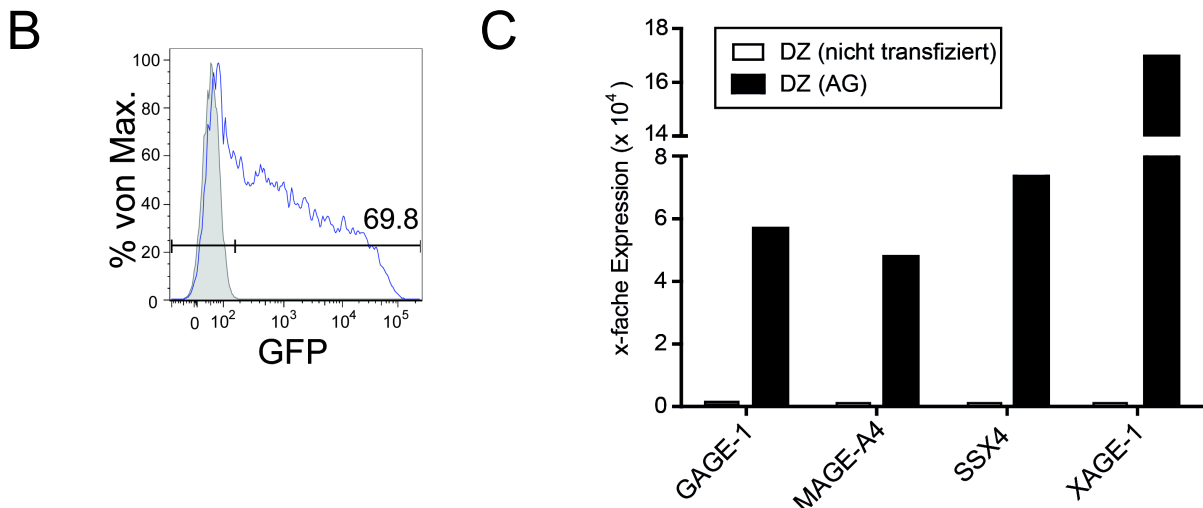


Abb. 4.5: Überprüfung der DZ-Maturierung und -Transfektion vor De-novo-Induktion

(A) Innerhalb von drei Tagen mit Cocktail 6 maturierte DZ, wurden anhand typischer Marker für die DZ-Reifung analysiert (HLA-DR, CD80, CD83, CD86, CD40 und CCR7). CD14-positive Zellen stellten die Monozyten-Fraktion dar. Die Reinheit der mDZ wurde anhand des T-Lymphozyten-spezifischen Oberflächenmoleküls CD3 festgestellt. (B) Die ausgereiften DZ wurden mit den CrossTAG-5-TTA-ivt-mRNS-Spezies transfiziert. Um die Expression zu verifizieren, wurde ein Aliquot der mDZ mit 10 µg eGFP-ivt-mRNS transfiziert und nach sechs Stunden Inkubation bei 37°C im Durchflusszytometer quantifiziert (nicht transfizierte mDZ sind grau dargestellt). (C) Zusätzlich wurde auf Transkriptebeine die erfolgreiche Elektroporation der Cross-TAG-Antigen-ivt-mRNS (GAGE-1, MAGE-A4, SSX4 und XAGE-1; DZ (AG)) mit Hilfe der quantitativen *Real-Time* PCR überprüft. Als Referenz zur Quantifizierung der Antigen-RNS-Mengen in transfizierten mDZ diente die cDNS von nicht transfizierten mDZ (DZ (nicht transfiziert)). Zur Normalisierung der eingesetzten cDNS-Mengen wurde das Haushaltsgen α -Enolase herangezogen. Die Berechnung erfolgte mittels absolut quantifizierter CP-Werte.

Für die De-novo-Induktion von TTA-spezifischen T-Zellen wurden Monozyten-depletierte PBL eingesetzt und vor der ersten Stimulation bezüglich der Zusammensetzung der verschiedenen Zellsubpopulationen durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.6 B). Spezifische Oberflächenmarker für B-, NK-, T- und regulatorische T-Zellen wurden untersucht. Mit 85,8% machten CD3-positive T-Lymphozyten den größten Teil der PBL-Population aus. Davon waren 28,1% CD8-positiv und wie erwartet beinahe doppelt so viele CD4-positiv (55%). Von den T-Zellen waren 13,4% weder CD8- noch CD4-positiv. Ein sehr geringer Anteil der CD4-positiven Zellen zeigten die für regulatorische T-Zellen typischen Marker FoxP3 und CD25 (0,5%). Der geringe Anteil an B-Zellen und Monozyten (CD19-positiv, 1,0%; CD80-positiv, 2,6%) spiegelt die nach der Plastikadhärenz verbliebenen Zellen wider. Mit 2,8% der gesamten lebenden PBL-Population machen NK-Zellen ebenfalls einen geringen Teil aus (Abb. 4.6).

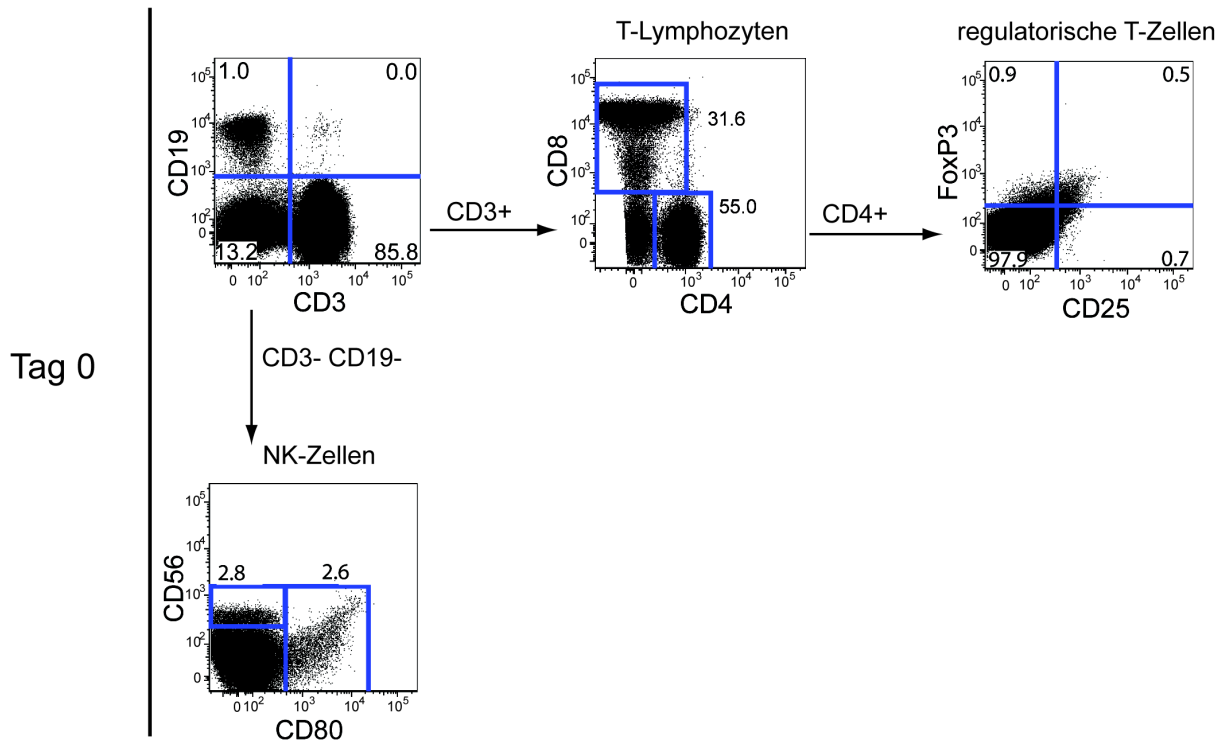


Abb. 4.6: Analyse der Monozyten-depletierten PBL-Population vor De-novo-Induktion

Vor Kokultivierung wurden die Monozyten-depletierten PBL hinsichtlich ihrer Zusammensetzung der unterschiedlichen Zellpopulationen untersucht. Die Zellen wurden auf lebende einzelne Lymphozyten vorselektiert. Mittels spezifischer monoklonaler Antikörper wurde der Anteil an B-Zellen (CD19-positiv), NK-Zellen (CD56-positiv), CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Lymphozyten sowie CD4⁺-regulatorischen T-Zellen (FoxP3-positiv, CD25-positiv) untersucht.

4.1.4.3 Restimulation und Klonierung TTA-reaktiver CD8⁺ T-Zellen

Einen Tag vor Restimulation wurde ein kleiner Teil der PBL-Kultur mit mDZ reaktiviert und 12 Stunden später der Prozentsatz an spezifisch aktivierten, CD137-exprimierenden CD8⁺ T-Zellen untersucht. Hierfür wurden PBL, die de novo (Tag 0) mit Kontroll- oder CrossTag-5-TTA-ivt-mRNS-elektroporierten mDZ stimuliert worden waren, erneut mit 5-TTA-exprimierenden mDZ kokultiviert. Das Verhältnis von CD4- zu CD8-T-Zellen hat sich im Vergleich zur Zusammensetzung vor De-novo-Induktion um-gekehrt, so dass nunmehr doppelt so viele CD8⁺- als CD4⁺-T-Zellen vorlagen. Dieser Effekt trat unabhängig davon auf, ob die PBL an Tag 0 mit CrossTag-5-TTA-ivt-mRNS-transfizierten oder kontrollelektroporierten mDZ kokultiviert wurden. Der Anteil an CD137-positiven CD8⁺ T-Zellen war in der 5-TTA-stimulierten PBL-Kultur (41%) um das 3-fache höher als die der PBL-Kultur, die an Tag 0 mit Kontroll-elektroporierten mDZ kokultiviert wurde (13,7%) (Abb. 4.7).

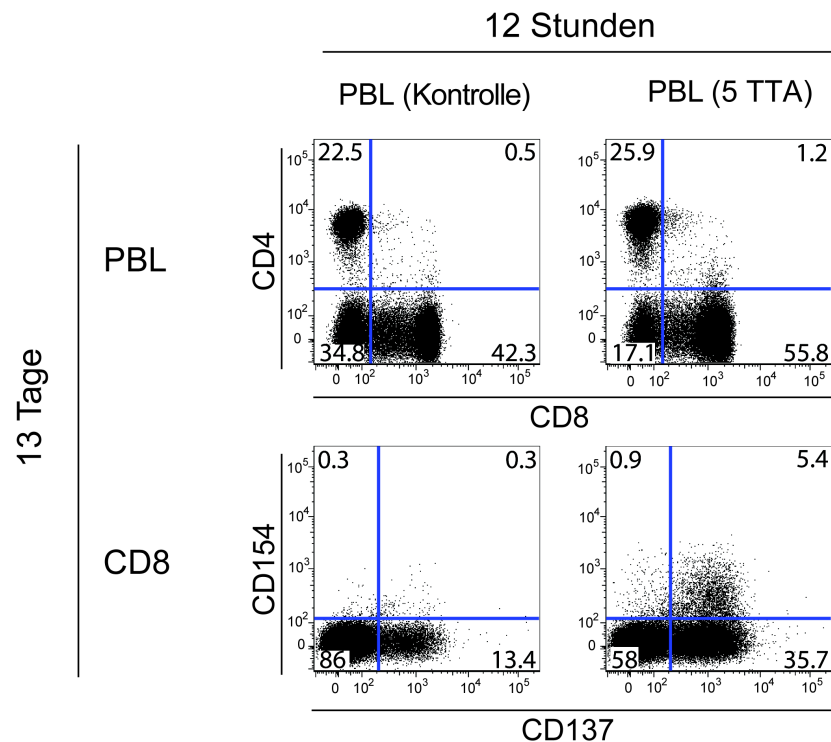


Abb. 4.7: CD137-Expression auf spezifisch restimulierten CD8⁺ T-Zellen

PBL, die de novo mit Kontroll- oder 5-TTA-ivt-mRNS-elektroporierten allogenen mDZ induziert worden waren (in Klammern hinter PBL gekennzeichnet), wurden 13 Tage später mit CrossTAg-5-TTA-ivt-mRNS-transfizierten mDZ restimuliert. Im Streudiagramm dargestellt ist der prozentuale Anteil an TTA-reaktiven CD8⁺ T-Zellen 12 Stunden nach Restimulation. Die dargestellten Zellpopulationen wurden vorselektiert auf lebende, einzelne Lymphozyten (PBL) oder auf CD8⁺ T-Zellen (CD8).

Einen Tag nach der Überprüfung der CD137-Expression wurde die gesamte PBL-Population mit CrossTAg-5-TTA-ivt-mRNS-transfizierten mDZ restimuliert. Spezifisch aktivierte CD8⁺ T-Lymphozyten wurden anhand des Oberflächenmarkers CD137 identifiziert und mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsortiergerätes (FACS-Aria, BD) in 96-Loch-Rundbodenplatten sortiert. Dabei wurden eine, drei oder sechs Zellen pro Kavität verteilt und die Zellen im Anschluss mit einem Restimulationscocktail, bestehend aus von vier verschiedenen Spendern stammenden PBL, 5-TTA-exprimierenden allogenen mLCL, PHA oder Anti-CD3/CD28-Antikörpern und den Zytokinen IL-2 sowie IL-15 kultiviert. Die Sortierungsstrategie ist in Abb. 4.8 verdeutlicht. Einzelne CD8⁺ T-Lymphozyten wurden selektiert und davon die CD137-positive Fraktion in die Kulturplatten sortiert. Wie am Tag zuvor beobachtet, betrug der Anteil an CD137⁻, CD8-doppelt-positiven T-Lymphozyten rund 30%. Nicht in Kulturplatten sortierte T-Zellen wurden in eine CD137-negative oder CD137-positive CD8⁺ T-Zelllinie separiert und für weitere 14 Tage unter Zusatz von humanem IL-2 kultiviert.

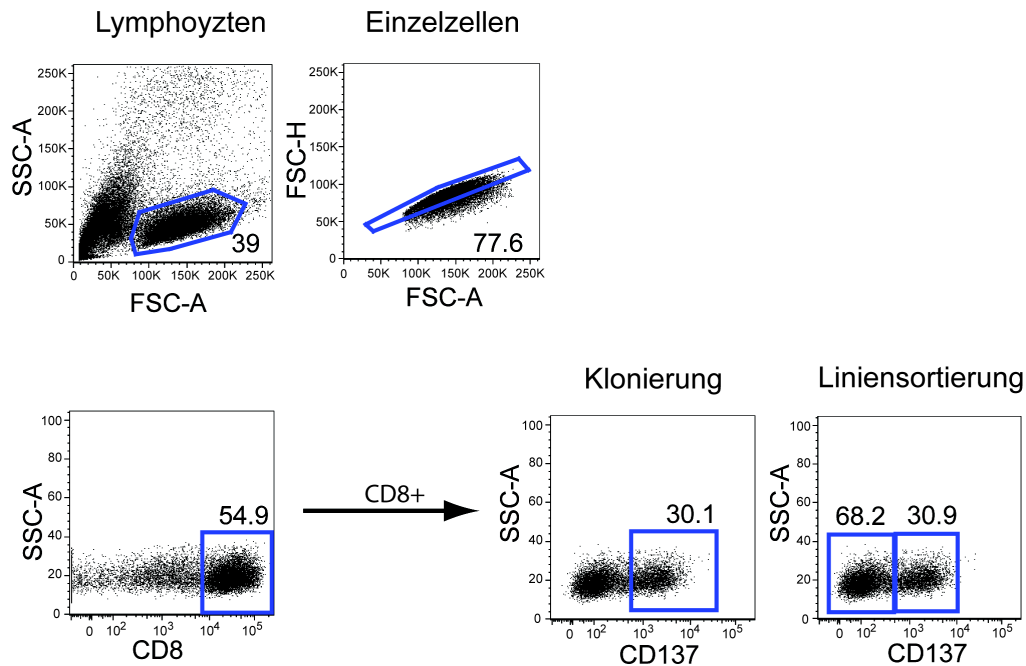


Abb. 4.8: Sortierung und Klonierung CD137-positiver CD8⁺ T-Zellen nach spezifischer Restimulation
 Die Sortierung CD8⁺ CD137⁺ T-Zellen in 96-Loch-Rundbodenplatten erfolgte 12 Stunden nach Restimulation. Es wurden eine, drei oder sechs Zellen pro Kavität sortiert. Die verbleibenden Zellen wurden als CD8⁺ CD137⁺ Linie und CD8⁺ CD137⁻ Linie sortiert (Linien sortierung) und in Kultur gehalten. Die Zellpopulation wurde auf einzelne Lymphozyten vorselektiert.

4.1.5 Überprüfung der TTA-Spezifität von isolierten CD8⁺ T-Zellklonen

Zwei Wochen nach der Klonierung CD137-positiver CD8⁺ T-Zellen erfolgte die Analyse der sortierten T-Zellklone auf TTA-Spezifität. Die Linien wurden in einem Versuchsansatz eingesetzt, um die Sortierungseffizienz zu untersuchen. Hierfür wurde die CD137-positive und CD137-negative T-Zelllinie mit 5-TTA-exprimierenden mDZ (DZ (5 TTA)) oder Kontroll-elektroporierten mDZ stimuliert. Es konnte eine höhere sezernierte IFN- γ -Menge durch die CD137-positiven im Vergleich zu den CD137-negativen T-Zellen beobachtet werden (1,5-fach). In beiden Linien führten die Kontroll-mDZ zu keiner geringeren Zytokinausschüttung der T-Zellen wie die Antigen-transfizierten mDZ. Dies korrelierte mit der in Abschnitt 4.1.4.3 in Abb. 4.7 beobachteten TTA-unspezifischen Hochregulierung von CD137 auf T-Zellen, die mit Kontroll-DZ kokultiviert worden waren. Eine mögliche Erklärung für die höhere IFN- γ -Ausschüttung durch die CD137-positive T-Zelllinie nach Kokultivierung mit Kontroll-mDZ ist die fehlende Konkurrenz der transfizierten TTA mit endogenen Antigenen. Dadurch könnten mehr Antigene präsentiert worden sein, gegen die TTA-unspezifische T-Zellen spezifisch reagierten und somit möglicherweise stärker stimuliert werden konnten.

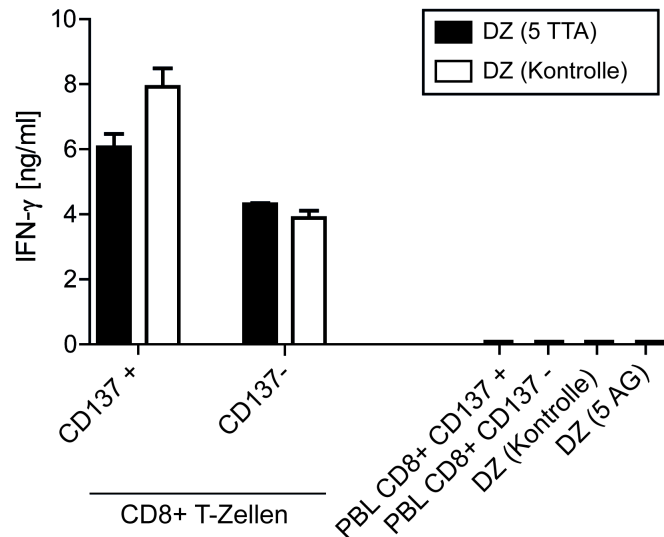


Abb. 4.9: Zytokinsekretion der sortierten T-Zelllinien nach spezifischer Stimulation

CD137-negative und CD137-positive CD8⁺ T-Zelllinien wurden mit CrossTA_g-5-TTA-ivt-mRNS-transfizierten mDZ (DZ (5AG)) oder mit Kontroll-elektroporierten mDZ (DZ(Kontrolle)) kokultiviert. Als Negativkontrolle wurden die Zelllinien und DZ (Kontrolle oder 5AG) einzeln kultiviert. Die IFN- γ -Menge im Überstand wurden nach 24 Stunden mittels ELISA quantifiziert.

Des Weiteren wurden einzelne expandierte T-Zellklone auf TTA-Spezifität überprüft, indem sie mit CrossTA_g-5-TTA-ivt-mRNS-transfizierten DZ (DZ (5 TTA)) oder Kontroll-transfizierten DZ (DZ (Kontrolle)) kokultiviert wurden und die sezernierten IFN- γ -Mengen im ELISA quantifiziert wurden. Aufgrund der in Abb. 4.9 gezeigten Ergebnisse der T-Zelllinien, mussten auf klonaler Ebene ebenso T-Zellen erwartet werden, die TTA-unspezifisch gegen mDZ reagierten. In Abb. 4.10 A sind diejenigen T-Zellklone dargestellt, die nicht ausschließlich TTA-spezifisch reagierten. Dazu gehörten Zellen, die nach Stimulation keinerlei IFN- γ sezernierten (nicht-reaktiv). Ein Teil der Klone wurde sowohl nach Stimulation mit Kontroll-transfizierten DZ als auch nach Kokultivierung mit CrossTA_g-5-TTA-ivt-mRNS-transfizierten mDZ aktiviert. Dies lässt auf eine starke Reaktivität gegen allogene-MHC-I-Moleküle der für die PBL fremden DZ schließen. Da die transfizierten mDZ jedoch zu einer stärkeren Zytokinsekretion der Klone führte, war anzunehmen, dass die TZR kreuzreaktiv gegen TTA waren und somit im Zusammenhang der Allo-Reaktivität eine Teilabhängigkeit bestand (partiell TTA-abhängig). Eine dritte, ebenfalls alloreaktive Gruppe reagierte mit der Ausschüttung identischer Zytokinmengen unabhängig von den eingesetzten Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) (TTA-unspezifisch). Daneben konnte auch eine Reihe an TTA-spezifischen T-Zellklonen identifiziert werden (Abb. 4.10 B). Die von Kontroll-elektroporierten mDZ sezernierten IFN- γ -Mengen wurden als Hintergrundsignal markiert (rote Linie). Abgesehen von den Klonen M214, M219 und M334, die unspezifisch sehr geringe Zytokinmengen nach Kokultivierung mit den Kontroll-transfizierten DZ sezernierten, reagierten alle Klone ausschließlich auf die 5-TTA-exprimierenden DZ und zeigten keinen unspezifischen Hintergrund.

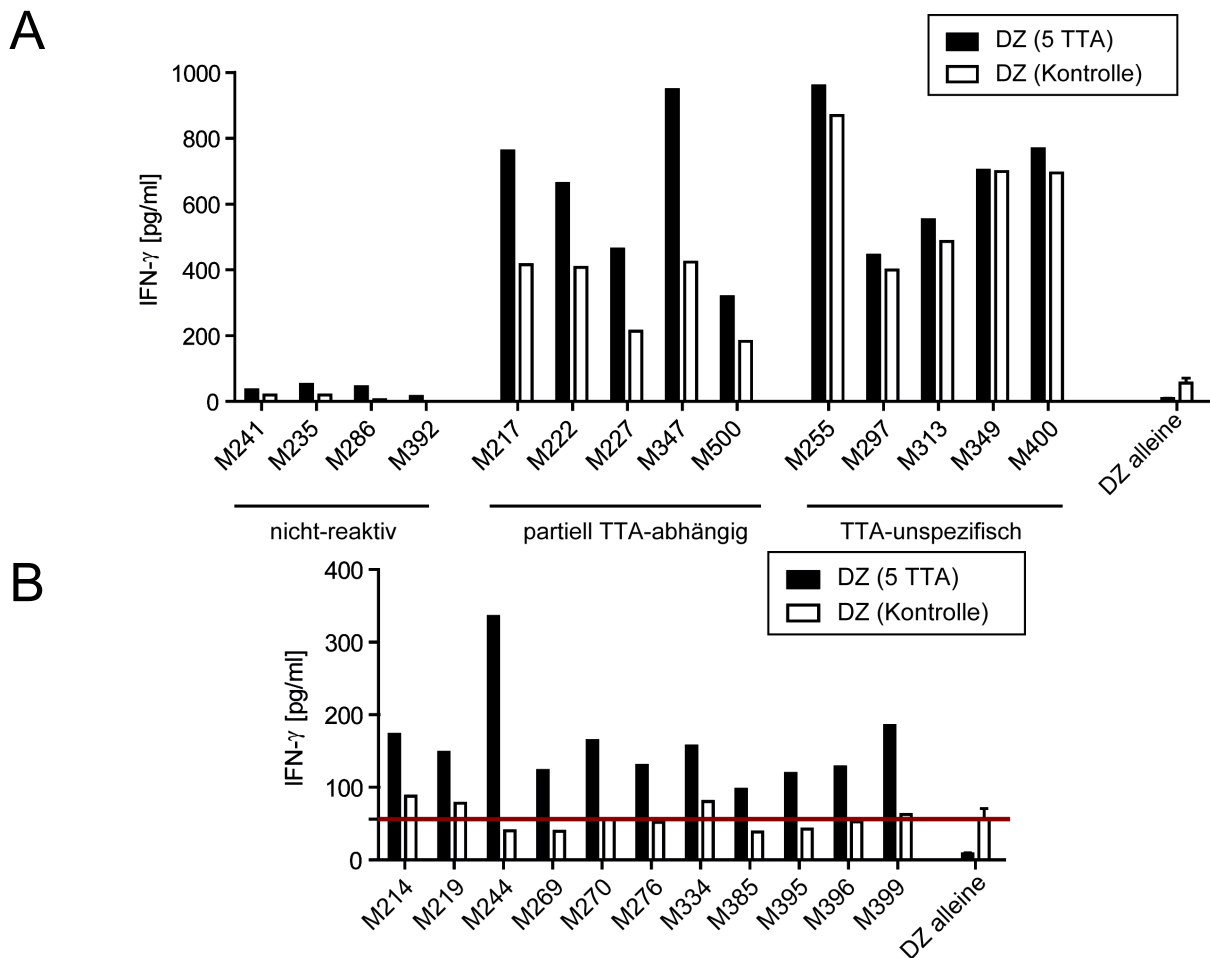


Abb. 4.10: Identifizierung TTA-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone

Überstände wurden 24 Stunden nach der Kokultivierung von Effektor- und Zielzellen abgenommen und mittels ELISA analysiert. Die T-Zellklone wurden mit 5-TTA-ivt-mRNS-transfizierten (DZ (5 TTA)) oder Kontroll-elektroporierten mDZ (DZ (Kontrolle)) kokultiviert. **(A)** Im Diagramm dargestellt sind T-Zellklone, die entweder nicht-reaktiv, partiell TTA-abhängig oder TTA-unspezifisch auf die Stimulation mit mDZ reagiert haben. **(B)** T-Zellklone, die spezifisch durch TTA-exprimierende mDZ aktiviert wurden, wurden für die TZR-Analyse separiert. Die rote Linie zeigt die durch die mit Kontroll-elektroporierten mDZ freigesetzten IFN- γ -Mengen an.

TTA-spezifische Klone, die in ausreichender Zahl zur Verfügung standen, wurden in einem weiteren Experiment mit zu DZ alternativen APZ kokultiviert, um die Antigenspezifität zu identifizieren. Als APZ wurden mLCL herangezogen, die aus PBL des DZ-Spenders generiert worden waren. Nach Transfektion der mLCL mit Cross-TAg-ivt-mRNS, spezifisch für jeweils eines der fünf TTA (T-Antigen), wurden diese mit den T-Zellklonen kokultiviert. Als Negativkontrolle fungierten GFP-ivt-mRNS-transfizierte mLCL (Abb. 4.11 A und B). Alle Ergebnisse wurden auf die von T-Zellen ohne spezifischen Stimulus sezernierten IFN- γ -Mengen normalisiert. So war z.B. der Klon M395 spezifisch für das Antigen NY-ESO-1, zusätzlich konnte eine geringe Kreuzreaktivität gegen das Antigen SSX4 beobachtet werden. Der Klon M399 sezernierte erhöhte Mengen an Zytokin nach Stimulation mit mLCL, die das Antigen GAGE-1 präsentierten (Abb. 4.11 A). Ohne APZ

hingegen sezernierten beide Klone kaum detektierbare Mengen an IFN- γ (nicht gezeigt). Neben den zuvor spezifisch getesteten Klonen wurden auch einige der mit DZ getesteten partiell TTA-abhängigen T-Zellklone mit den mLCL kokultiviert (Abb 4.11 B). Auch der Einsatz von alternativen APZ (mLCL) bestätigte die Kreuzreaktivität der Zellen, da alle mLCL inklusive der GFP-ivt-mRNS-transfizierten mLCL, von den T-Zellen erkannt wurden. Wurden hingegen die Klone ohne APZ kultiviert, konnte kein IFN- γ nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Daneben schienen die Klone (Klon M227 und Klon M500) das Antigen MAGE-A4 bzw. das Antigen SSX4 zu erkennen, denn mLCL, die dieses Antigen exprimierten, führten zu einer deutlich stärkeren Zytokinfreisetzung durch die T-Zellklone. Die APZ selbst sezernierten kein detektierbares IFN- γ (nicht gezeigt). Insgesamt standen nur sehr geringe Zellzahlen der jeweiligen T-Zellklone für die Analyse zur Verfügung. Aus diesem Grund konnte für einige Klone nur 1,5 – 1,6-fach mehr IFN- γ nach spezifischer Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle im Überstand detektiert werden.

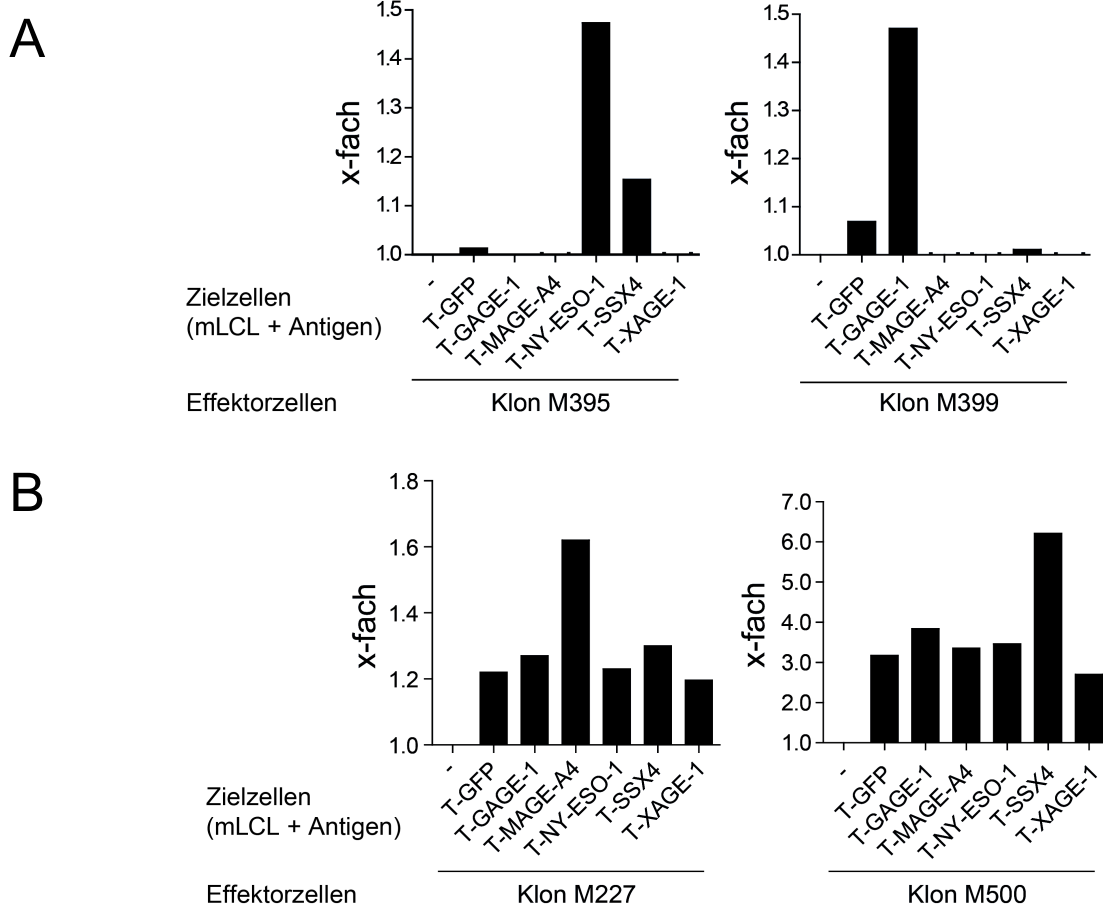


Abb. 4.11: Identifizierung der Antigenspezifität einzelner CD8⁺ T-Zellklone

mLCL wurden mit jeweils der CrossTAG-ivt-mRNS für ein TTA transfiziert und mit unterschiedlichen CD8⁺ T-Zellklonen kokultiviert. Die dargestellten Werte wurden auf die ohne mLCL kultivierten T-Zellklone normalisiert. Gemessen wurde die IFN- γ -Sekretion 24 Stunden nach der Kokultivierung. In **(A)** sind die beiden für NY-ESO-1 bzw. GAGE-1-spezifischen T-Zellklone M395 bzw. M399 dargestellt. **(B)** Zwei der partiell TTA-abhängigen T-Zellklone wurden zur Bestätigung der Alloreaktivität mit TTA-exprimierenden mLCL kokultiviert. Als Kontrolle fungierten eGFP-ivt-mRNS-transfizierten mLCL.

Es wurde weiterführend untersucht, ob die beiden partiell TTA-abhängigen T-Zellklone M227 und M500 möglicherweise statt einer Alloreaktivität eventuell die von den mLCL endogen exprimierten Zielantigene MAGE-A4 bzw. SSX4 erkannten. Daher wurden die mLCL auf Transkriptebene dahingehend analysiert, ob die mRNS beider Antigene detektierbar waren (Abb. 4.12). Allerdings konnten weder MAGE-A4 noch SSX4 in den mLCL nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle für die PCR-Analyse fungierte wieder die cDNS von Mel624.38. Folglich handelte es sich bei der beobachteten Kreuzreaktivität der Klone M227 und M500 wahrscheinlich um eine Reaktivität gegen ein allogenes MHC-I-Molekül oder gegen ein von mLCL-exprimiertes Antigen.

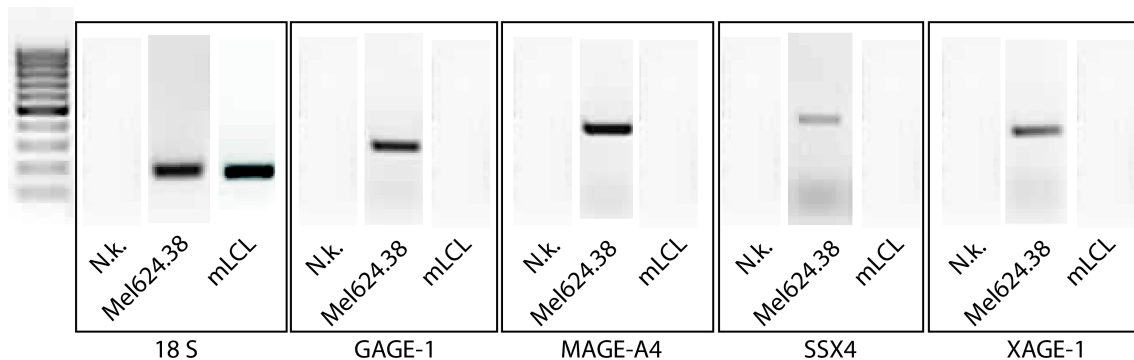


Abb. 4.12.: Expressionsanalyse von TTA in mLCL auf Transkript-Ebene

Die für die Verifizierung der Antigenspezifität der Klone eingesetzten mLCL wurden hinsichtlich ihrer Expression von vier TTA mittels PCR auf Transkriptebene untersucht. Als Positivkontrolle fungierte cDNS von Mel624.38. Die Negativkontrolle (N.k.) schloss unerwünschte Kontaminationen mit DNS aus.

4.1.6 Weitere Charakterisierung TTA-spezifischer TZR

Die Schwierigkeit bei der Analyse der TZR von CD8⁺ T-Zellen in vitro ist das zeitlich sehr eingeschränkte Expansionsfenster, da optimale Kulturbedingungen für T-Zellklone oft schwer vorhersagbar sind. Die in 4.1.5 gezeigten TTA-spezifischen CD8⁺ T-Zellklone verloren bald ihre Reaktivität und ihre Fähigkeit zur Proliferation, wodurch es unmöglich war, mit den Originalklonen weitere Analysen zur Bestimmung der Spezifität der TZR durchzuführen. Aus diesem Grund musste eine alternative Herangehensweise in Betracht gezogen werden.

4.1.6.1 Verwendung einer TZR-Bibliothek für den Einsatz transgener TZR

Voraussetzung für die therapeutische Anwendung von TZR ist das Wissen über die funktionellen Eigenschaften und die molekularen Charakteristika der TTA-spezifischen TZR. Hierfür ist es nicht

notwendigerweise erforderlich die ursprünglichen T-Zellen, von denen die TZR stammen, für weiterführende Analysen zu expandieren, denn die Rezeptorsequenzen können ohne Funktionsverlust auf andere Rezipientenzellen übertragen und von diesen exprimiert werden (Wilde et al., 2009). Da die kommerzielle Synthese der gesamten TZR α - bzw. TZR β -Sequenzen oft sehr schwierig bzw. finanziell sehr kostspielig ist, stellte die von Slavoljub Milošević etablierte TZR-Bibliothek eine sinnvolle Alternative dar (Abb. 4.13). Die Bibliothek beruht auf dem Prinzip, dass sich in jedem Vektor (im Folgenden als pVA-/pVB-A116-Vektor bezeichnet) eine variable (V) α - oder V β -Sequenz befindet, die gefolgt wird von einer mit den Restriktionsschnittstellen flankierten Linkersequenz (5' *FspI*; 3' *DraIII* für α -Ketten und *BstEII* für β -Ketten). Diese kann gegen jede beliebige TZR α -/ β -CDR3-Region inklusive J-Region, die synthetisch hergestellt wird, ausgetauscht werden. Nach Hybridisierung der entsprechenden Sense- und Antisense-Oligomere enthalten die entstandenen doppelsträngigen DNS-Fragmente bereits die zum Austausch mit der Linkersequenz erforderlichen Ligationsstellen. Für die anschließende konstante (C-) Region des TZR wurde für eine effizientere Paarung der exogenen TZR α - bzw. TZR β -Kette in den Rezipientenzellen Sequenzen der C-Regionen aus der Maus verwendet (nachfolgend als „murinisiert“ bezeichnet). Des Weiteren erlaubte die Sequenzveränderung eine leichte Detektierbarkeit der TZR β -Kette des Rezeptors auf der Zelloberfläche mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch die TZR β -C-Region binden kann (murine-TZR β -C-Region). Die Vektoren enthalten außerdem eine Ampicillinresistenzkassette, wodurch erfolgreich die mit der TZR-CDR3-Region ligierten Vektoren selektiert werden können. Für die Synthese von TZR-ivt-mRNS wurde ein T7-Promotor vor die TZR-Sequenz geschaltet. Der 116-Nukleotid-lange Poly-A-Schwanz am 3' Ende des TZR sorgte für die Stabilisierung der mRNS.

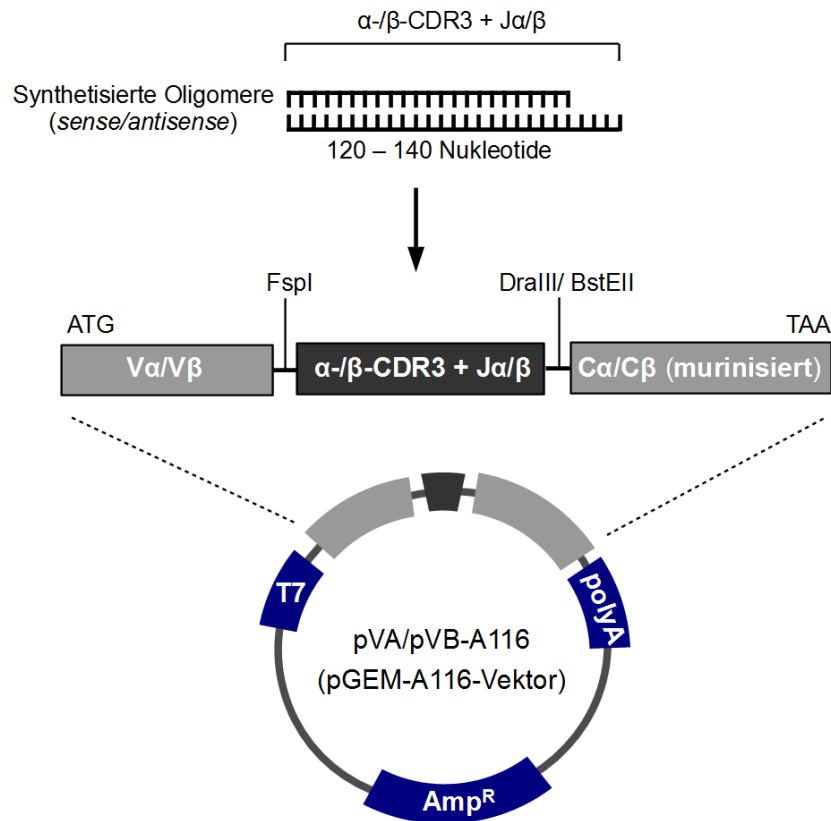


Abb. 4.13: Prinzip der TZR-Bibliothek nach S. Milošević

Die TZR-Bibliothek beruht auf einer Vielzahl von Vektoren (Ursprungsvektor ist der pGEM-A116-Vektor), die jeweils eine bestimmte variable (V) α - oder V β -Kette beinhalten, gefolgt von einer Linker-Region, die beliebig gegen jede TZR α -/ β -CDR3-Region mit entsprechender *joining* (J)-Region austauschbar ist und von einer konstanten (C-) Region (Maussequenzen, murinisiert) abgeschlossen wird. Die CDR3- und J-Region der α - bzw. β -Kette des zu klonierenden TZR wird in Form von 120-140 Nukleotid-langen *sense* und *antisense* Oligomeren kommerziell synthetisiert. Nach der Hybridisierung enthalten die entstandenen DNS-Fragmente bereits am 5' Ende die passende Enzymschnittstelle *FspI* und am 3' Ende die Schnittstelle *DraIII* (für α -Ketten) bzw. *BstEII* (für β -Ketten), um sie zwischen das im Vektor pVA/pVB enthaltene V-Segment und C-Segment klonieren zu können. Mit Hilfe der im Vektor befindlichen Ampicillinresistenzkassette erfolgt die Selektion auf erfolgreich ligierte Vektoren. Da das Vektorsystem außerdem einen T7-Promotor und einen poly-A-Schwanz aufweist, ist es für die Synthese von *invitro*-mRNA geeignet.

4.1.6.2 Etablierung von geeigneten Testsystemen zur Analyse von transgenen TZR

Bevor die TZR-Bibliothek ihre Anwendung in der Analyse der TTA-spezifischen CD8⁺ T-Zellklone fand, wurde das System anhand eines TZRs getestet, dessen Epitop und HLA-Restriktion bekannt war. Außerdem galt es für diesen Zweck geeignete TZR-Rezipientenzellen und Zielzellen zu finden. Die Rezipientenzellen mussten einige wichtige Eigenschaften aufweisen, um für die TZR-Analyse einsetzbar zu sein. Zum einen mussten sie den CD8-Korezeptor exprimieren, da zu Beginn der Analyse unklar war, ob die zu testenden Rezeptoren Korezeptor-abhängig waren. Zum anderen mussten die Zellen leicht expandierbar sein, um innerhalb kurzer Zeit eine ausreichende

Menge an Zellen zu erhalten. Des Weiteren mussten sie mittels Elektroporation den TZR aufnehmen und exprimieren können, da sich ivt-mRNS aufgrund der einfachen Synthese und schnellen Proteinexpression für eine aufwandsarme Analyse anbot. Nicht zuletzt ist die funktionelle Fähigkeit der Rezipientenzellen, z.B. definierte Zytokine in ausreichender Menge zu sekretieren, um eine spezifische Stimulation über den transgenen (tg) TZR überprüfen zu können, eine essentielle Voraussetzung. Im Falle der APZ wurden Zellen benötigt, die die Effektorzellen aufgrund des Peptidprofils der APZ auf den HLA-Molekülen nicht unerwünscht aktivierten. So durften sie beispielsweise das Zielprotein des tgTZR nicht endogen exprimieren, da andernfalls eine Negativkontrolle unmöglich würde. Die gleichzeitige endogene Expression des Zielproteins für den endogenen TZR der Effektorzellen durch die APZ musste ebenfalls unbedingt vermieden werden, da sonst nicht zu unterscheiden wäre, ob die Effektorzellen über den endogenen oder tgTZR stimuliert wurden.

4.1.6.2.1 CD8⁺ T-Zellen als TZR-Rezipienten

Da die zu untersuchenden TZR ursprünglich aus CD8⁺ T-Zellen isoliert wurden, lag es nahe, als TZR-Rezipientenzellen ebenfalls CD8⁺ T-Zellen zu verwenden. Aus diesem Grund wurden zunächst zwei etablierte CD8⁺ T-Zellklone getestet, deren endogener TZR weitgehend charakterisiert war. Als Testrezeptor wurde ein EBNA-1-Peptid-spezifischer, HLA-B*3502-restringierter TZR (von S. Milošević) eingesetzt: TZR-EBNA-1. Die TZR α - und TZR β -CDR3-Region sowie die J-Region wurden, wie in Abschnitt 4.1.6.1 beschrieben, in die entsprechenden pVA- bzw. pVB-Vektoren der TZR-Bibliothek kloniert und in ivt-mRNS umgeschrieben (Tab. 2.15). Die Transfektion der Zellen fand frühestens elf Tage nach der letzten Restimulation statt, um Zellen in der ruhenden Phase für die Versuche einzusetzen und unspezifisch sezerniertes Zytokin zu vermeiden. Das kommerziell synthetisierte Zielpeptid wurde von außen auf die angegebenen Zielzellen geladen. Der erste zu testende T-Zellklon JB4 war HLA-A*0201-spezifisch. Zwei Millionen JB4-Zellen wurden mit jeweils 15 μ g der TZR α -/ β -EBNA-1-ivt-mRNS transfiziert (400 V, 5 ms) und sechs bzw. 24 Stunden später auf TZR-Expression durchflusszytometrisch quantifiziert. Nach sechs Stunden wiesen 17% der T-Zellen die tgTZR- β -Kette auf der Zelloberfläche auf, nach 24 Stunden waren es immer noch über 10% (Abb. 4.14 A). Transfizierte und nicht transfizierte T-Zellen wurden mit den mLCL-MRE kokultiviert, da diese HLA-A*0201-positiv, sowie HLA-B*3502-negativ waren und somit ausschließlich den endogenen TZR stimulierten. So wurde getestet, ob der T-Zellklon in der Lage war, nach spezifischer Stimulation ausreichende Mengen an IFN- γ zu sekretieren. Sowohl die nicht transfizierten als auch die TZR-EBNA-1-tragenden JB4-Zellen sezernierten daraufhin 2000-3000 pg/ml IFN- γ . Als zusätzliche Positivkontrolle wurden transfizierte JB4-Zellen mit einem unspezifischen Stimulationsgemisch aus Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)/ Ionomycin behan-

delt, wodurch im Zellüberstand mehr als 4000 pg/ml IFN- γ detektiert wurden. Für die Stimulation über den tgTZR wurden LCL-MSC (HLA-A*0201-negativ, HLA-B*3502-positiv) mit dem EBNA-1-Peptid für zwei Stunden bei 37°C beladen und anschließend mit den transfizierten T-Zellen kokultiviert. Als Kontrolle wurden unbeladene LCL-MSC ebenfalls mit TZR-EBNA-1-JB4-Zellen gemischt. Trotz der geringen Oberflächenexpression sekretierten die TZR-EBNA-1-JB4-Zellen ausschließlich in Anwesenheit der Peptid-beladenen LCL-MSC bereits mehr als 500 pg/ml IFN- γ . In Abwesenheit von APZ konnte kaum Zytokin nachgewiesen werden und auch für die APZ ohne T-Zellen war kein Zytokin nachweisbar (Abb. 4.14 B).

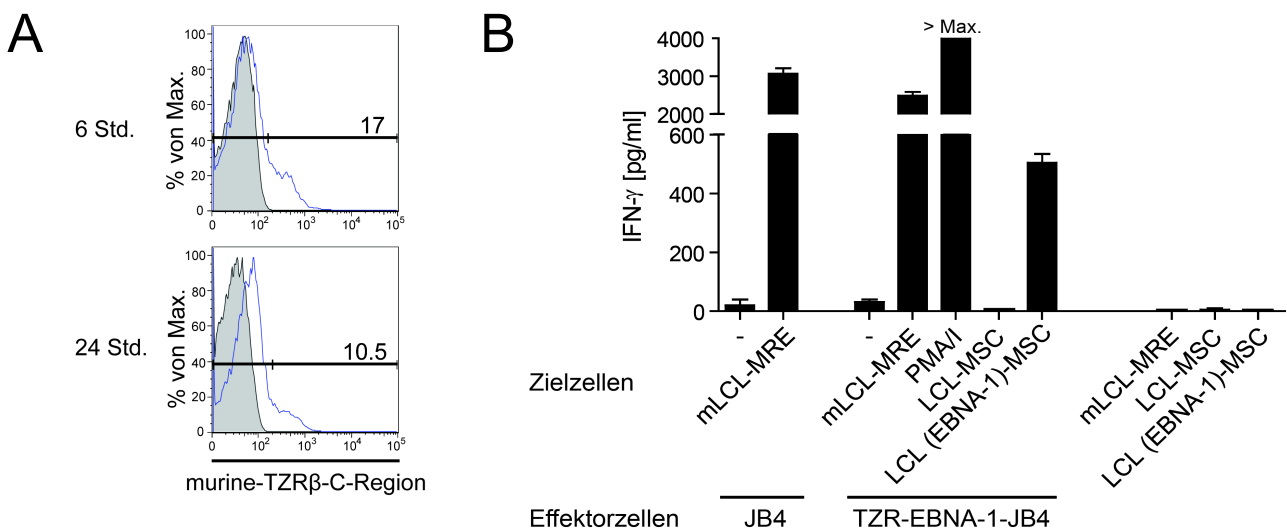


Abb. 4.14: CD8⁺ T-Zellklon JB4 als tgTZR-Rezipientenzellen

Als TZR-Rezipient fungierte der CD8⁺ T-Zellklon JB4, dessen endogener TZR HLA-A*0201 spezifisch ist. **(A)** Ein EBNA-1-Peptid-spezifischer, HLA-B*3502-restringierter TZR wurde in den CD8⁺ T-Zellklon JB4 transfiziert (400 V, 5 ms; 15 μ g ivt-mRNS pro TZR-Kette) und die Expression des tgTZR 6 und 24 Stunden nach Elektroporation durchflusszytometrisch analysiert. Die im Histogramm dargestellte Zellpopulation wurden auf lebende Lymphozyten vorselektiert. Die Expression des TZR wurde anhand eines Antikörpers, der spezifisch an die C β -Region des tgTZR band, nachgewiesen (grau dargestellt sind mit Antikörper gefärbte, untransfizierte JB4 T-Zellen). **(B)** 1x10⁵ TZR-EBNA-1-transfizierte JB4 T-Zellen wurden mit der identischen Zellzahl an EBNA-1-Peptid-beladenen oder unbeladenen LCL (HLA-B*3502-positiv; Spender MSC) kokultiviert. Als Positivkontrolle wurde der Klon unspezifisch mit PMA/Ionomycin (2,5 ng/ml PMA, 250 ng/ml Ionomycin; >Max.: das Maximum des IFN- γ -Standards wurde erreicht) bzw. spezifisch für den endogenen TZR mit HLA-A*0201-positiven mLCL (Spender: MRE) (1x10⁵) stimuliert. Die Standardabweichung ergab sich aus den in Duplikaten angesetzten Messwerten.

Als zweite potentielle TZR-Empfängerzellen fungierte der CD8⁺ T-Zellklon IVSB. Er erkennt das Tyrosinase-Epitop (YMDGTMSQVA, kurz YMD) und ist HLA-A*0201-restringiert. Die Zellen wurden – ähnlich wie beim JB4-Klon – mit jeweils 15 μ g der TZR α -/ β -EBNA-1-ivt-mRNS transfiziert (760V, 2.5 ms) und die Expression nach sechs Stunden im Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 4.15 A). Hier war mit 77% TZR β -EBNA-1-positiven Zellen eine deutlich bessere Oberflächenexpression als

bei den JB4-Zellen zu verzeichnen. Die Fähigkeit zur IFN- γ -Produktion nach spezifischer Stimulation wurde durch die Kokultivierung des transfizierten IVSB-Klons (TZR-EBNA-1-IVSB) mit der Melanomzelllinie Mel624.38 (HLA-A*0201-positiv, Tyrosinase-positiv) oder mit Tyrosinase-ivt-mRNS-transfizierten mLCL-MRE (HLA-A*0201-positiv) überprüft. Die Anwesenheit der Mel624.38-Zielzellen in der Kokultur stimulierte eine deutliche IFN- γ -Sekretion der IVSB-Zellen (2000 pg/ml). Die Stimulation mit den transfizierten mLCL-MRE resultierte in einer weitaus geringeren IFN- γ -Sekretion (200 pg/ml). Als Negativkontrolle für den endogenen TZR fungierte die Melanomzelllinie MelA375 (HLA-A*0201-positiv, Tyrosinase-negativ). Die Funktionalität des tgTZR wurde mit den EBNA-1-Peptid-beladenen LCL-MSC verifiziert. Ohne Peptidbeladung erfolgte keine Stimulation des TZR-EBNA-1-IVSB. Trotz der weitaus besseren tgTZR-Expression in den IVSB-Zellen führte dies nicht zu höheren Zytokinkonzentrationen im Überstand (600 pg/ml IFN- γ). Sowohl die TZR-EBNA-1-IVSB-Zellen als auch die APZ sekretierten keine oder nur geringe Mengen an IFN- γ , wenn sie alleine kultiviert wurden.

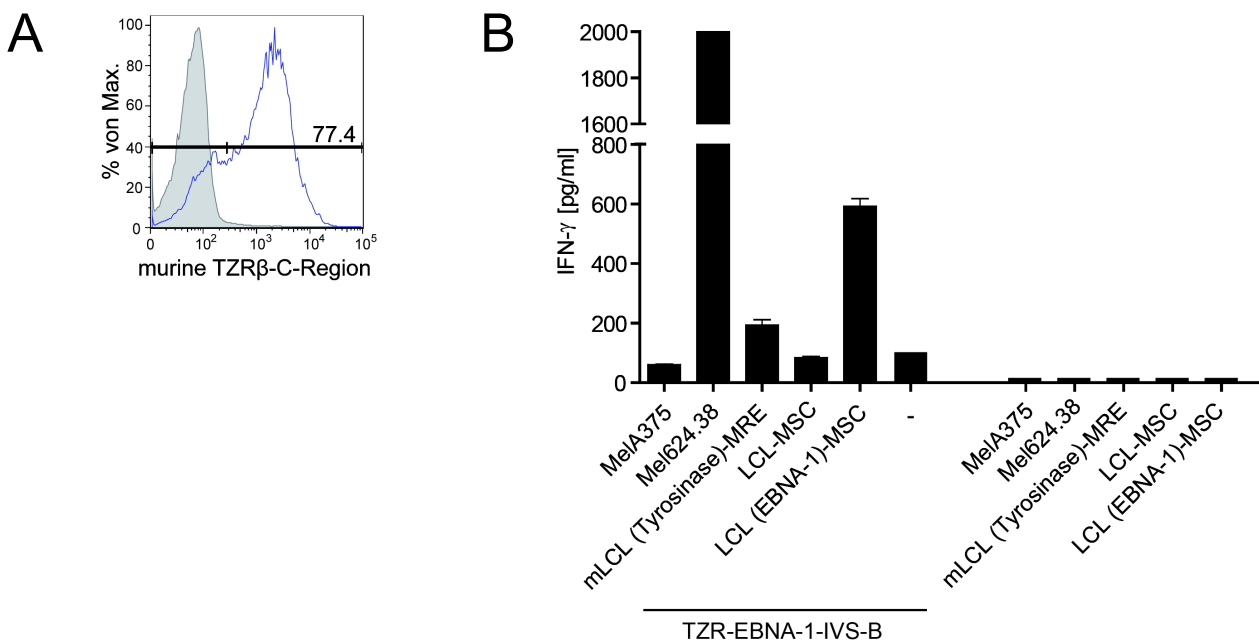


Abb. 4.15: CD8⁺ T-Zellklon IVSB als tgTZR-Rezipientenzellen

Als TZR-Rezipient fungierte der CD8⁺ T-Zellklon IVSB, dessen endogener TZR HLA-A*0201-restringiert und Tyrosinase-spezifisch (YMNGTMSQVA) ist. **(A)** Der TZR-EBNA-1 wurde in den CD8⁺ T-Zellklon transfiziert und die Expression des tgTZR sechs Stunden nach Elektroporation durchflusszytometrisch analysiert. Die im Histogramm dargestellte Zellpopulation wurde auf lebende Lymphozyten vorselektiert. Die Expression des tgTZR wurde anhand eines Antikörpers, der spezifisch an die TZR β -C-Region band, nachgewiesen (grau dargestellt sind mit Antikörper-gefärbte, untransfizierte IVSB-T-Zellen). **(B)** 1x10⁵ der TZR-EBNA-1-transfizierte IVSB-T-Zellen wurden mit EBNA-1-Peptid-beladenen oder unbeladenen LCL (HLA-B*3508-positiv, Spender: MSC) kokultiviert. Als Positivkontrolle wurde die Melanomzelllinie Mel624.38 (HLA-A*0201-positiv, Tyrosinase-positiv) oder Tyrosinase-ivt-mRNS-transfizierte mLCL (HLA-A*0201-positiv; Spender: MRE) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde die Melanomzelllinie MelA375 (HLA-A2*0201-positiv, Tyrosinase-negativ) verwendet. Die Standardabweichung ergab sich aus den in Duplikaten angesetzten Messwerten.

4.1.6.2.2 PBL als tgTZR-Rezipienten-Zellen

Auf der Suche nach Zellen, die nach Stimulation größere Mengen an IFN- γ ausschütten konnten, als es bei den vorgestellten Klonen der Fall war, wurden als nächstes PHA-expandede PBL erwogen. Monozyten-depletierte PBL konnten leicht mit Hilfe eines unspezifischen Stimulus (PHA) und IL-2 in beliebigen Mengen expandiert werden. Die resultierende Population bestand anschließend hauptsächlich aus T-Zellen. Um diese am Leben zu erhalten, mussten die Zellen nach spätestens 21 Tagen erneut mit PHA stimuliert werden. Die Zeit zwischen 11 und 16 Tagen nach Stimulation war die günstigste Zeit für die Versuchsdurchführung, da sich die Zellen hier erfahrungsgemäß am besten transfizieren ließen, sich in einer ruhenden Phase befanden und nicht unspezifisch Zytokine sezernierten. Außerdem waren sie vital genug, um nicht zu viele tote Zellen in der Kultur anzureichern, die die Elektroporationsbedingungen verändern und die Expression verringerten.

Die optimalen Elektroporationsbedingungen (Gene Pulser Xcell™, Biorad) wurden mit GFP-ivt-mRNS und unterschiedlichen Bedingungen ausgetestet. Es zeigte sich, dass es für das Überleben der Zellen wichtig war, nicht mehr als zwei Millionen auf einmal zu elektroporieren, da sonst die Zelldichte zu hoch war und die voreingestellten Elektroporationsbedingungen nicht durchgeführt werden konnten. Die beste Expression wurde unter den Bedingungen 900 V, 2,3 ms oder 760 V, 2,5 ms erreicht. Die Sterberate lag bei beiden Bedingungen unter 10%. Die Expression für GFP-ivt-mRNS lag bereits nach fünf Stunden bei über 80% und blieb innerhalb der ersten 24 Stunden relativ konstant (Abb. 4.16). Aus diesem Grund wurden im folgenden Experiment die Zellen mit 760V und 2,5 ms transfiziert.

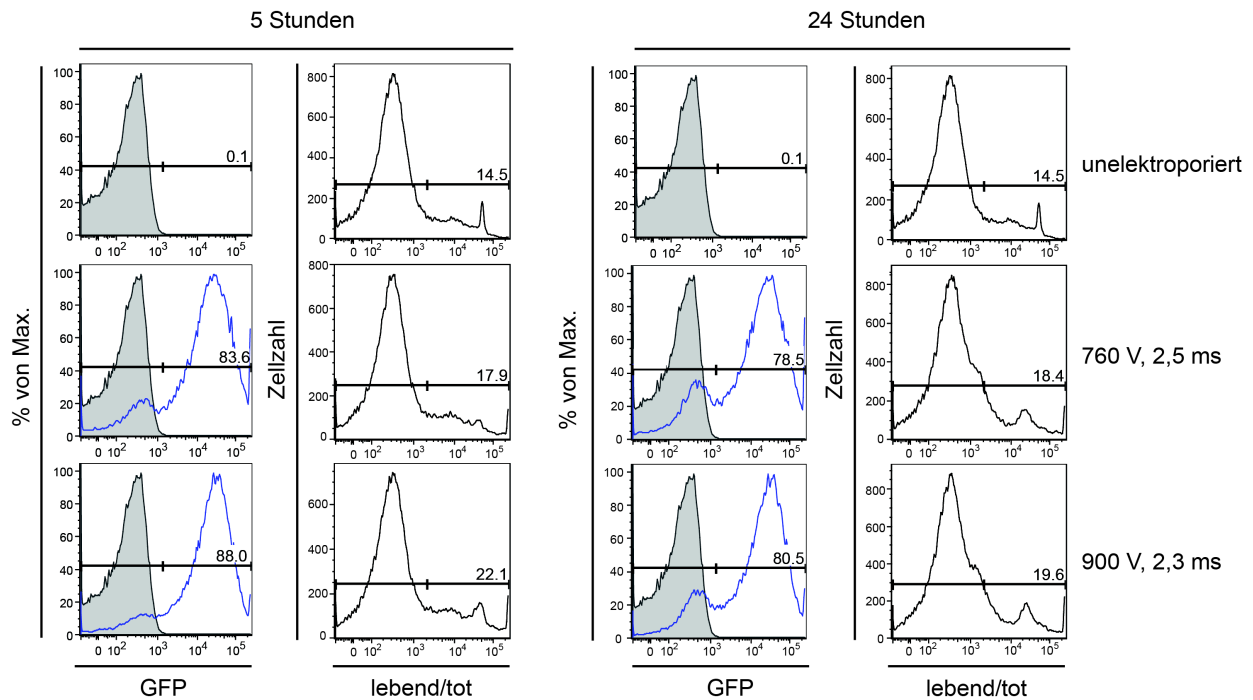


Abb. 4.16: Elektroporationsbedingungen für PHA-expandede PBL

PBL (Spender: SJ) wurden elf Tage nach Stimulation mit 8 µg GFP-ivt-mRNS unter verschiedenen Elektroporationsbedingungen (760 V, 2,5 ms oder 900 V, 2,3 ms) transfiziert. Die Expression wurde fünf und 24 Stunden später durchflusszytometrisch analysiert. Die toten Zellen wurden mit dem DAPI-Farbstoff angefärbt. Die Zellen wurden auf Lymphozyten vorselektiert.

Die Kokultivierung von LCL mit PBL führte zu einer starken Stimulation der T-Zellen, die in einem hohen IFN-γ-Hintergrund resultierte (600-1200 pg/ml IFN-γ) und unabhängig von der Expression des tgTZR in den PBL beobachtet wurde (Abb 4.17). Da PBL zunächst mit autologen mLCL kokultiviert wurden, handelte es sich bei der beobachteten Stimulation offenbar nicht um eine Reaktivität gegen allogene HLA-Moleküle. Daher wurde ferner überprüft, ob dieser Effekt auf EBV-spezifische T-Zellen in der PBL-Population zurückzuführen war, denn mLCL waren EBV-transformierte und immortalisierte B-Zellen und exprimierten daher einige wenige EBV-spezifische Proteine. Daher wurden PBL eines EBV-negativen Spenders (CE) eingesetzt, die mit allogenen mLCL (MRE) kokultiviert wurden. Aber auch hier wurden große Zytokinmengen im Kulturüberstand detektiert. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Kokultur von PBL mit mLCL oder LCL vermieden.

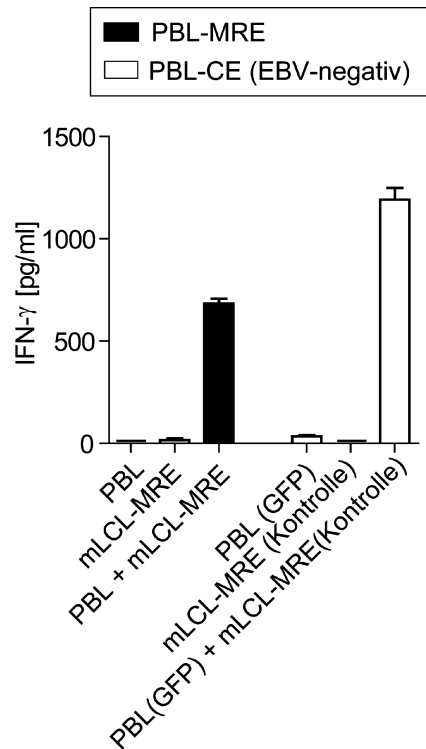


Abb. 4.17: IFN- γ -Sekretion durch PBL in Anwesenheit von mLCL

PBL und mLCL des selben Spenders (MRE, schwarze Balken) wurden kokultiviert und nach 24 Stunden die IFN- γ -Sekretion durch die PBL im ELISA quantifiziert. PBL eines EBV-negativen Spenders (CE) wurden mit 10 μ g GFP-ivt-mRNS transfiziert und mit allogenen mLCL (MRE), die Kontroll-elektroporiert worden waren, kokultiviert. Die Standardabweichung ergab sich aus den in Duplikaten angesetzten Messwerten.

Um nun PBL als tgTZR-Rezipienten zu testen, musste an dieser Stelle ein zum TZR-EBNA-1 alternativer TZR verwendet werden, da für diesen Rezeptor außer LCL keine anderen APZ zur Verfügung standen. So wurden PHA-explantierte PBL an Tag 14 nach Stimulation mit jeweils 15 μ g ivt-mRNS pro TZR α - β -Kette des EBNA-1-spezifischen TZR und zusätzlich mit dem nicht in der TZR-Bibliothek generierten TZR-D115 (S. Wilde), der Tyrosinase-spezifisch und HLA-A*0201-restringiert ist, transfiziert. Der TZR-EBNA-1 wurde zum Vergleich der Oberflächenexpression und als Negativkontrolle in der Kokultur mitgeführt. Die Expression wurde sechs Stunden nach Elektroporation durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.18 A). Das Verhältnis von CD8⁺ zu CD4⁺ T-Zellen in der PBL-Population war etwas zugunsten der CD8⁺ T-Zellen verschoben. Die Oberflächenexpression der beiden tgRezeptoren lag für CD4⁺ T-Zellen bei über 70% und für CD8⁺ T-Zellen bei rund 50%. Die transfizierten PBL wurden mit der Melanomzelllinie Mel624.38 in unterschiedlichen PBL:APZ-Verhältnissen kokultiviert (Abb. 4.18 B). Es zeigte sich, dass die PBL bereits in Anwesenheit gleicher Zielzellzahlen maximale Zytokinmengen sezernierten bzw. eine Sättigung erreicht war, denn eine Steigerung der Zielzellzahl führte nicht zu einer Mehrproduktion an IFN- γ . Damit war die detektierte Zytokinmenge ausschließlich abhängig von der PBL-Zellzahl. Generell wurden nur die TZR-D115-tgPBL stimuliert, da die TZR-EBNA-1-tgPBL kein Zielpeptid

oder HLA-Molekül auf den Mel624.38 finden konnten. Ziel- und Effektorzellen alleine sezernierten kein IFN- γ .

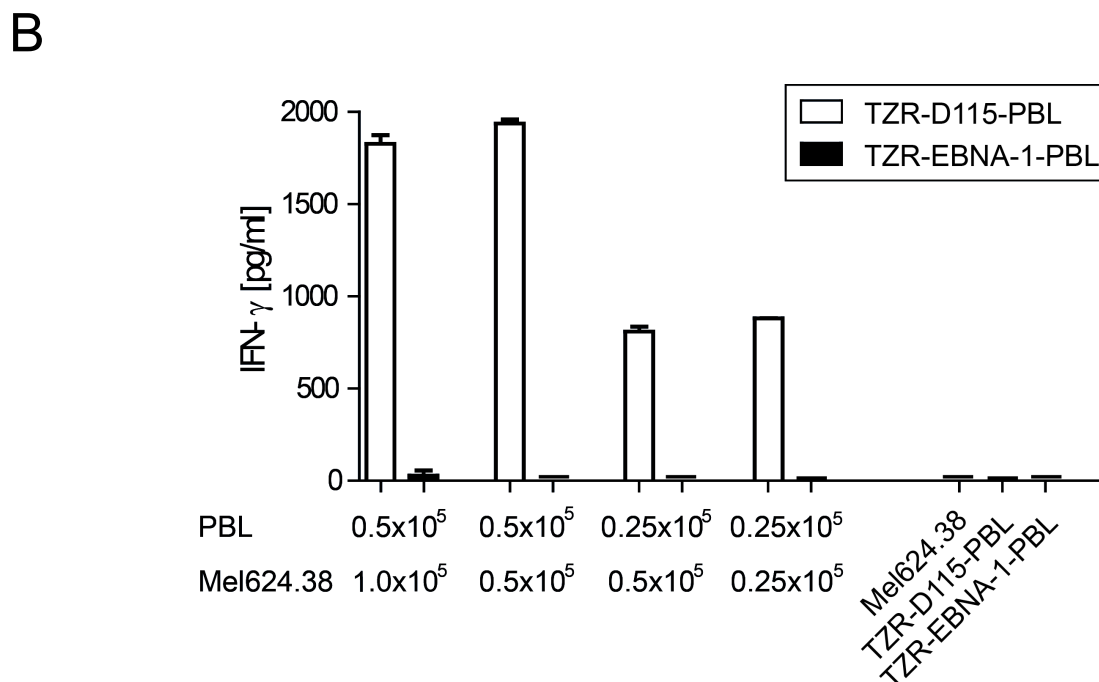
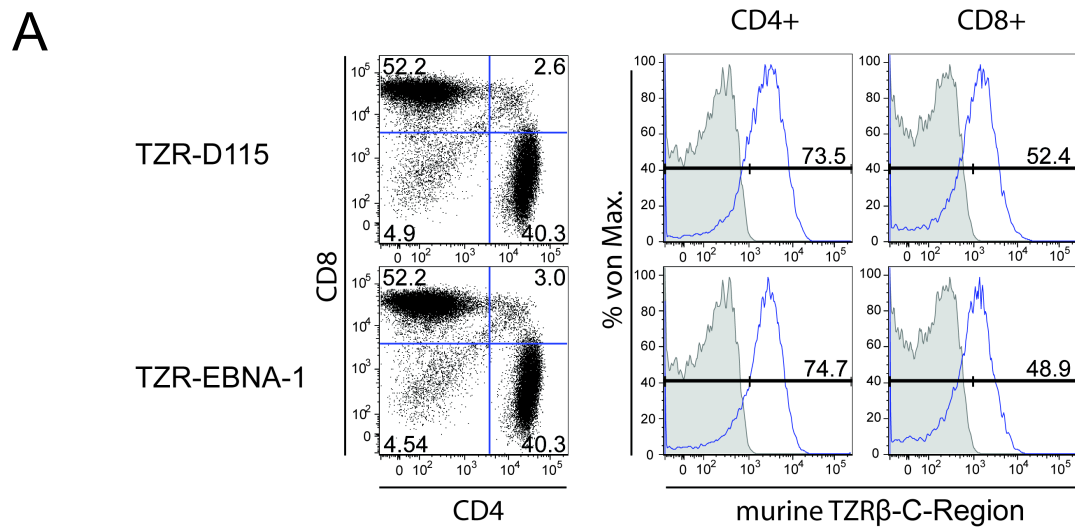


Abb. 4.18: PHA-expandierte PBL als tgTZR-Rezipientenzellen

Als TZR-Rezeptoren fungierten PHA-explantierte PBL (Spender: SJ) am Tag 14 nach Stimulation. **(A)** Der TZR-EBNA-1 oder der HLA-A*0201-restringierte, Tyrosinase-spezifische TZR-D115 wurde in PBL transfiziert (760 V, 2.5 ms) und die Expression des tgTZR sechs Stunden nach Elektroporation in der CD8⁺ bzw. CD4⁺ Subpopulation durchflusszytometrisch analysiert (grau dargestellt repräsentieren die mit Antikörper gefärbten, untransfizierten PBL). **(B)** Die TZR-EBNA-1-transfizierten bzw. TZR-D115-transfizierten PBL wurden mit der Melanomzelllinie Mel624.38 (HLA-A*0201-positiv, Tyrosinase-positiv) in unterschiedlichen Effektorzell- zu Zielzellverhältnissen kokultiviert. Die Standardabweichung ergab sich aus den in Duplikaten angesetzten Messwerten.

4.1.6.3 Analyse des XAGE-1-spezifischen TZR-M244

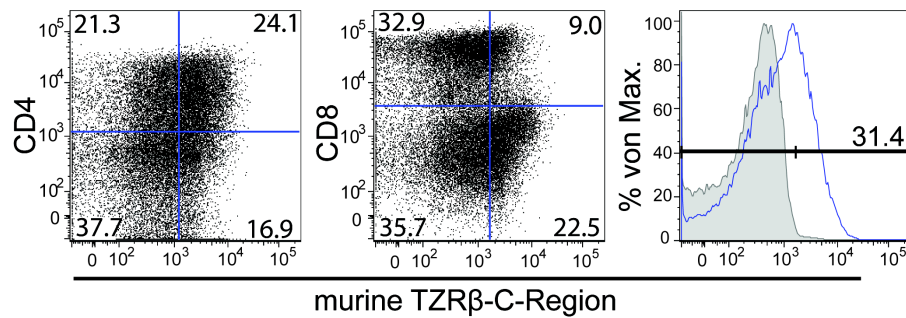
Dank der TZR-Bibliothek war es nun möglich, TZR außerhalb ihrer Ursprungszellen in alternativen, expandierbaren und funktionellen Rezipientenzellen zu exprimieren. Zu diesem Zweck musste zunächst die Sequenz der relevanten TZR ermittelt werden. Hierfür wurde die Gesamt-RNS der verbliebenen Zellen der TTA-reaktiven CD8⁺ T-Zellklone extrahiert und die TZR- α - bzw. β -Sequenzen anhand spezifischer Primer in einer PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Das Ergebnis der TZR-Analyse des T-Zellklones M244 ist in Tab. 2.16 aufgeführt. In den folgenden Kapiteln wurde dieser näher untersucht.

4.1.6.3.1 Identifizierung der Antigen-Spezifität

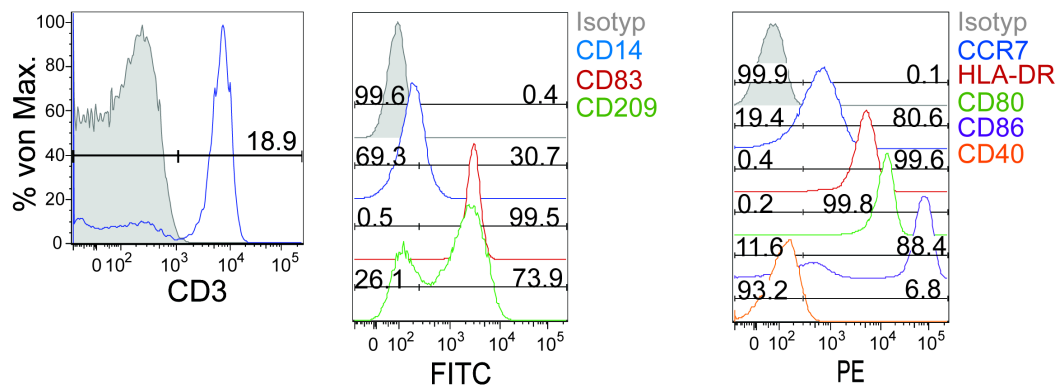
Wie im Kapitel 4.1.5 dargestellt, reagierte der T-Zellklon M244 nur auf mDZ, die mit CrossTAG-5-TTA-ivt-mRNS transfiziert worden waren. Da der ursprüngliche Klon in vitro nicht weiter zu expandieren war, wurde der TZR in die TZR-Bibliothek kloniert und der tgTZR-M244 in PBL transfiziert. Um Alloreaktivität zu verhindern, wurden autologe PBL zu den mDZ (DZ-Spender der De-novo-Induktion) eingesetzt. Die Oberflächenexpression in CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen wurde sechs Stunden nach der Elektroporation überprüft (Abb. 4.19 A). Insgesamt exprimierten 31% der T-Lymphozyten die β -Kette des tgTZR. Davon waren knapp 9% CD8⁺ und 22% CD4⁺ T-Zellen. Als APZ wurden DZ frisch mit dem Jonuleit-Cocktail maturiert, da dieser kein IFN- γ enthielt, welches im ELISA unter Umständen zu verfälschten Ergebnissen führen könnte. Die erfolgreiche Maturierung wurde, wie zuvor beschrieben, anhand geeigneter Oberflächenmoleküle überprüft (Abb. 4.19 B). Alle für die Stimulation der CD8⁺ T-Zellen wichtigen kostimulatorischen Moleküle, wie CD80, CD83, CD86 sowie CD209 (DC-SIGN) waren erwartungsgemäß hoch exprimiert. Mit Ausnahme des 30%igen Monozytenanteils und der geringen CD40-Expression wiesen die mDZ alle Merkmale von reifen DZ auf. Diese wurden mit jeweils 20 μ g der CrossTAG-Antigen-ivt-mRNS (codierend für GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO-1, SSX4 oder XAGE-1) oder mit YMD-GFP-ivt-mRNS transfiziert, für vier Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit den tgTZR-M244-transfizierten PBL für 24 Stunden kokultiviert (Abb. 4.19 C). Anhand des Stimulationsgemisches PMA/Ionomycin wurde die Fähigkeit der PBL überprüft, ausreichende Mengen an IFN- γ zu sekretieren. Die YMD-GFP-transfizierten mDZ fungierten als Negativkontrolle, indem sie ein für den tgTZR irrelevantes Protein bzw. Tyrosinase-Epitop (YMD) präsentierten. Die PBL wurden mit mDZ kokultiviert, die jeweils nur eines der TTA exprimierten. Als zusätzliche Positivkontrolle wurden die fünf DZ-Frakturen gemischt (Antigen-Pool), so dass jedes der 5 TTA repräsentiert wurde. Ausschließlich die CrossTAG-XAGE-ivt-mRNS-transfizierten mDZ bzw. die TTA-Pool-DZ-

Fraktion führten zu einer Stimulation der PBL (120 – 140 pg/ml IFN- γ). Kulturüberstände von separat kultivierten PBL oder APZ wiesen keine bzw. zu vernachlässigende IFN- γ -Konzentrationen auf. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die PBL, die den tgTZR-M244 exprimierten, einen Teil des von der CrossTag-XAGE-ivt-mRNS translatierte und prozessierte Protein spezifisch erkannt haben.

A



B



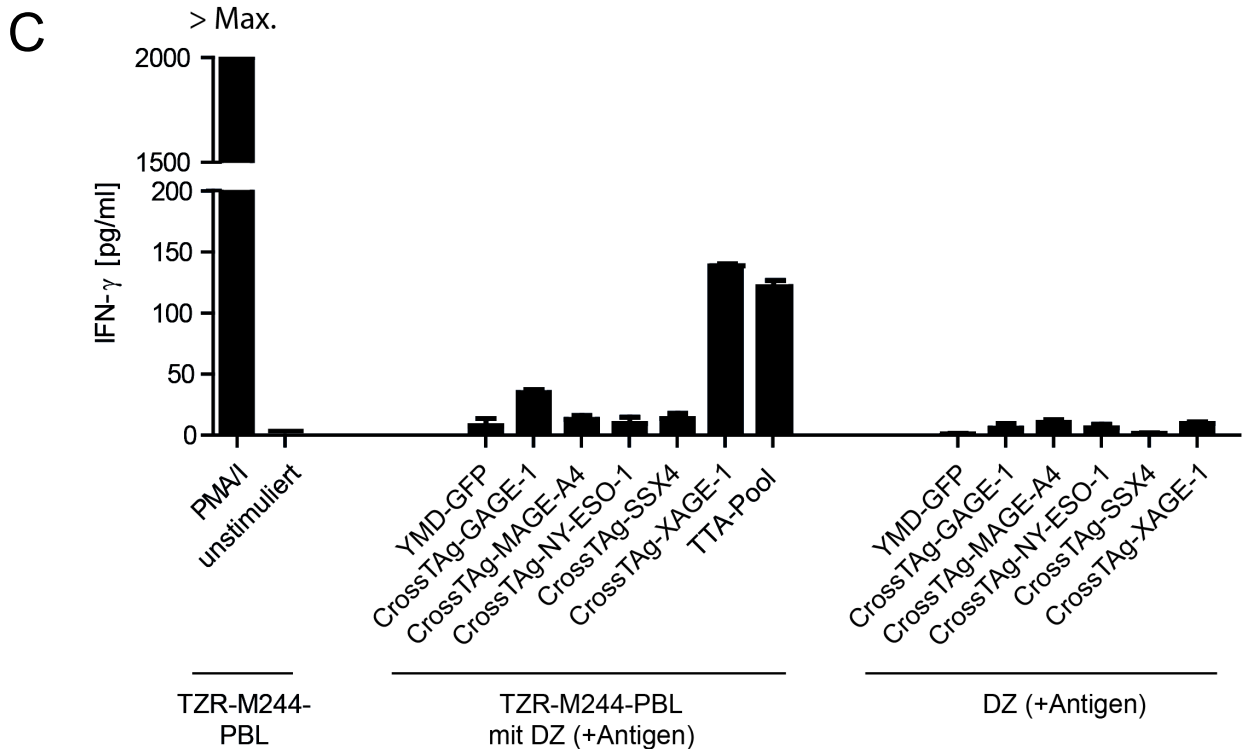


Abb. 4.19: Identifizierung der Antigenpezifität des transgen in PBL eingebrachten TZR-M244

Als TZR-Rezipient fungierten zu den im De-novo-Induktionsansatz verwendeten mDZ autologe PHA-expandede PBL (Spender: SJ). **(A)** Der TZR-M244 wurde in PBL transfiziert (760 V, 2.5 ms) und die Expression in CD8⁺ bzw. CD4⁺ Subpopulationen sechs Stunden nach der Elektroporation durchflusszytometrisch analysiert (im Histogramm grau dargestellte Population repräsentiert die mit Antikörper-gefärbten, untransfizierten PBL). **(B)** mDZ (autolog zu PBL) wurden hinsichtlich der Maturierungsmarker bzw. der Reinheit analysiert. **(C)** TZR-M244-transfizierte PBL wurden mit CrossTag-TTA-ivt-mRNS-transfizierten mDZ oder Kontroll-transfizierten mDZ (YMD-GFP) kokultiviert. Als Positivkontrolle wurden M244-transfizierte PBL unspezifisch mit PMA/Ionomycin stimuliert (>Max.: das Maximum des IFN-γ-Standards wurde erreicht). Die Standardabweichung ergab sich aus den in Duplikaten angesetzten Messwerten.

In einem nächsten Schritt wurde verifiziert, ob tatsächlich ein Epitop des XAGE-1-Antigens vom tgTZR-M244 erkannt wurde, oder ob es sich um die Erkennung eines durch die Verlinkung der Sortierungssignale, LAMP-1 und DC-LAMP-1, mit der XAGE-1-Sequenz neu entstandenen Epitops handelte. Zu diesem Zweck wurden zunächst PBL erneut mit dem TZR-M244 transfiziert und dieses Mal mit mDZ kokultiviert, die zum einen mit CrossTag-XAGE-1-ivt-mRNS und zum anderen mit XAGE-1-ivt-mRNS (ohne CrossTag-Sequenzen) transfiziert worden waren. Als Negativkontrolle fungierten GFP-ivt-mRNS-transfizierte mDZ und als Positivkontrolle das Gemisch aus mDZ, die alle fünf TTA repräsentierten. Die Überprüfung der Expression von PBL und DZ ist aus Abb. 4.20 A ersichtlich. Die Transfektion hatte mit 15% TZRβ-positiver T-Zellen drei Stunden nach Elektroporation nur mäßig funktioniert, war für ein eindeutiges Ergebnis aber ausreichend. Die Transfektion der mDZ war hocheffizient, da nach fünf Stunden schon bereits knapp 87% der Zellen GFP-positiv waren. Die PBL wurden sowohl mit mDZ stimuliert, die XAGE-1 in Kombination mit CrossTag, als auch ohne die Signalsequenzen transfiziert worden waren. Die Reaktivität der

PBL in Anwesenheit von XAGE-1 ohne CrossTag entsprach der 1:5 verdünnten XAGE-1-positiven Fraktion in dem DZ-Gemisch. Im Vergleich zu XAGE-1 ohne Signalsequenzen führte CrossTag-XAGE-1 zu einer etwa 2,5-fach stärkeren IFN- γ -Sekretion der PBL. Dies mag aufgrund einer besseren Prozessierung des XAGE-1-Proteins durch die Signalsequenzen zu Stande gekommen sein. Die APZ und PBL sezernierten einzeln kein IFN- γ . Schlussendlich konnte mit diesem Versuch eindeutig die XAGE-1-Spezifität des TZR-M244 bestätigt werden (Abb 4.20 B).

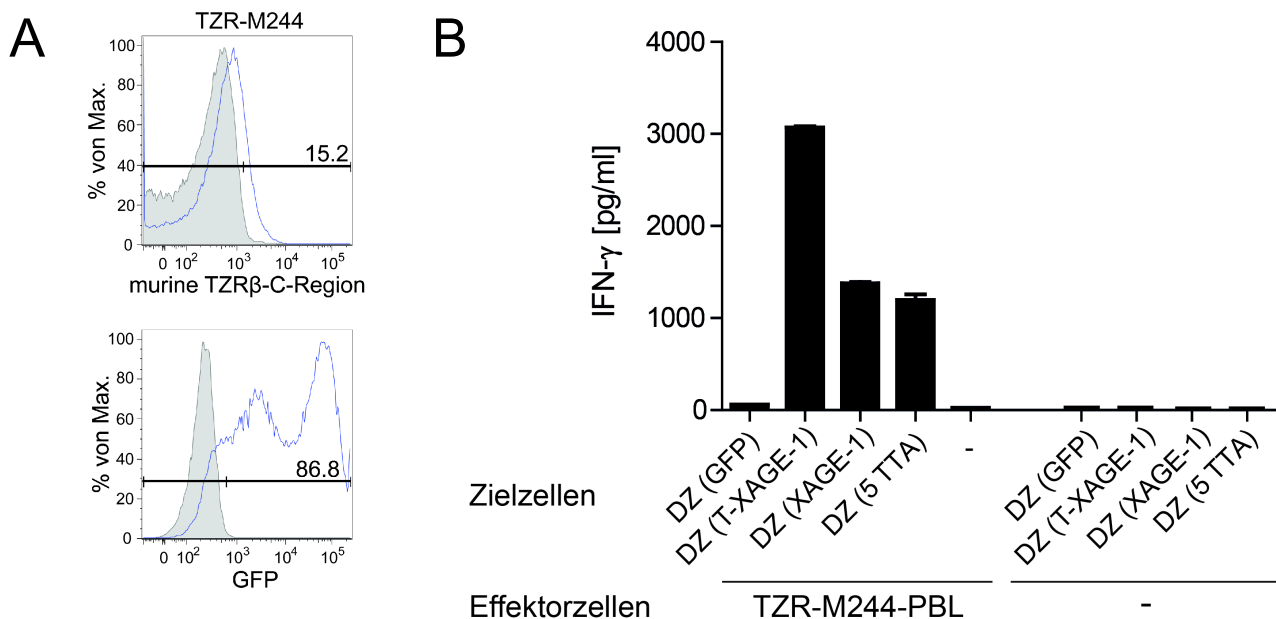


Abb. 4.20: Bestätigung der XAGE-1-Spezifität des TZR-M244

Als TZR-Rezipient fungierten PHA-expandede PBL des mDZ-Spenders (SJ) der De-novo-Induktion. **(A)** Der TZR-M244 wurde in PBL transfiziert und die Expression drei Stunden nach der Elektroporation durchflusszytometrisch analysiert (im Histogramm grau dargestellte Population repräsentiert die mit Antikörpergefärbten, untransfizierten PBL). 86,6% der Kontroll-transfizierten, autologen mDZ exprimierten fünf Stunden nach Elektroporation das GFP-Protein. **(B)** TZR-M244-transfizierte PBL wurden mit CrossTag-XAGE-1-ivt-mRNS-transfizierten (DZ (T-XAGE-1)), XAGE-1-ivt-mRNS-transfizierten (DZ (XAGE-1)) oder Kontroll-transfizierten mDZ (DZ (GFP)) kokultiviert. Außerdem wurden die PBL-TZR-M244 mit einem Pool an mDZ, in dem die Präsentation von allen fünf Antigenen vertreten war, kokultiviert. Die Standardabweichung ergab sich aus den in Duplikaten angesetzten Messwerten.

4.2 Induktion Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in vivo

Da die De-novo-Induktion von TTA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in vitro mit dem CrossTag-Antigen-ivt-mRNS-Konstrukt erfolgreich war, bot dies ein großes Potenzial nicht nur für die Generierung von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen, sondern könnte auch für den Einsatz von mit Cross-Tag-Antigen-ivt-mRNS-transfizierten DZ als Vakzine in der Krebstherapie dienen. Daher wurde in einem nächsten Schritt die Effizienz des Konstruktes, T-Zellen in vivo zu induzieren, anhand eines

etablierten Mausmodelles untersucht. Als Zielantigen wurde das Melan-A-Protein gewählt, gegen das viele Menschen bereits einen geringen Prozentsatz an spezifischen Vorläufer-T-Zellen aufweisen. Außerdem wurden für diesen Ansatz PBMZ und DZ desselben Spenders (autologer Ansatz) eingesetzt.

4.2.1 Überblick über die Aktivierung Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im NSG-Mausmodell

Das für die Untersuchung in der Arbeitsgruppe bereits etablierte NSG (NOD-scid IL-2R γ ^{null})-Mausmodell hat den Vorteil, dass diese Mäuse defizient für die IL-2-Rezeptor- γ -Kette sind und daher keine NK-, T- oder B-Zellen besitzen (Shultz et al., 1995). Dies bietet eine Nische für die Rekonstitution mit PBMZ, die nach Transfer von humanen Antigen-präsentierenden DZ aktiviert werden können. So kann eine dem humanen System vergleichbare Situation bezüglich der Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellen durch applizierte APZ geschaffen werden.

In Abb. 4.21 ist ein Überblick über den gesamten Versuchsablauf dargestellt. Der Versuchsansatz umfasste insgesamt 16 Mäuse, wobei jeweils vier Mäuse einer Gruppe zugeteilt wurden. Es gab demnach insgesamt vier Gruppen: eine Kontrollgruppe, die nur mit humanen PBMZ rekonstituiert wurde, eine Gruppe, die zusätzlich mit Antigen-ivt-mRNS-transfizierten DZ vakziniert wurde, eine Gruppe, die mit CrossTag-Antigen-ivt-mRNS-transfizierten DZ vakziniert wurde und zuletzt eine Gruppe, die eine 1:1-Mischung aus DZ erhielt, die entweder mit oder ohne CrossTag-Sequenzen-enthaltende mRNS elektroporiert wurde. Das verwendete Zielantigen Melan-A wies einen Aminosäureaustausch auf, denn das natürliche Epitop „EAAGIGILT“ wurde zu „ELAGIGILT“ (im Folgenden als „ELA“ gekennzeichnet) mutiert. Grund dafür ist die höhere Bindungsaffinität des „ELA-Peptides“ an die HLA-Bindegrube des Tetramers. An Tag 0 erhielten zunächst alle Mäuse intravenös 10×10^6 frisch aus menschlichem Blut aufgereinigte PBMZ. Nach 14 Tagen, die für eine Rekonstitution der menschlichen Zellen in der Maus ausreichte, erfolgte die erste intravenöse Vakzinierung (1×10^6 DZ pro Maus) der für die Gruppen entsprechend transfizierten DZ (außer der Kontrollgruppe). Die zweite Vakzinierung erfolgte analog zur ersten Vakzinierung nach weiteren sieben Tagen an Tag 21. An Tag 28 wurden die Mäuse getötet und die Milzzellen isoliert. Ein Teil der Milzzellen wurde mit Hilfe eines HLA-A*0201-Melan-A_(ELA)-Tetramers auf spezifische CD8⁺ T-Zellen überprüft bzw. die Zusammensetzung der Zellen untersucht (Panelfärbung). Die verbliebenen Milzzellen wurden für weitere zehn Tage in vitro kultiviert. Hierfür wurden die PBMZ der unterschiedlichen Versuchsansätze mit $0,3 \times 10^6$ der jeweiligen DZ wiederholt stimuliert und nach zwei Tagen mit 50U/ml IL-2 versetzt. Die Kontrollgruppe hingegen erhielt ausschließlich das für das Überleben der humanen Zellen notwendige humane IL-2 (hIL-2, 50U/ml). An Tag 38 wurden die PBMZ erneut auf Melan-A-spezifische CD8⁺ T-Zellen (Tetramerfärbung) bzw. ihre

Zellzusammensetzung hin überprüft. Des Weiteren wurde die funktionelle Fähigkeit zur Zytokin-freisetzung nach spezifischer Aktivierung Melan-A-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im ELISpot analysiert.

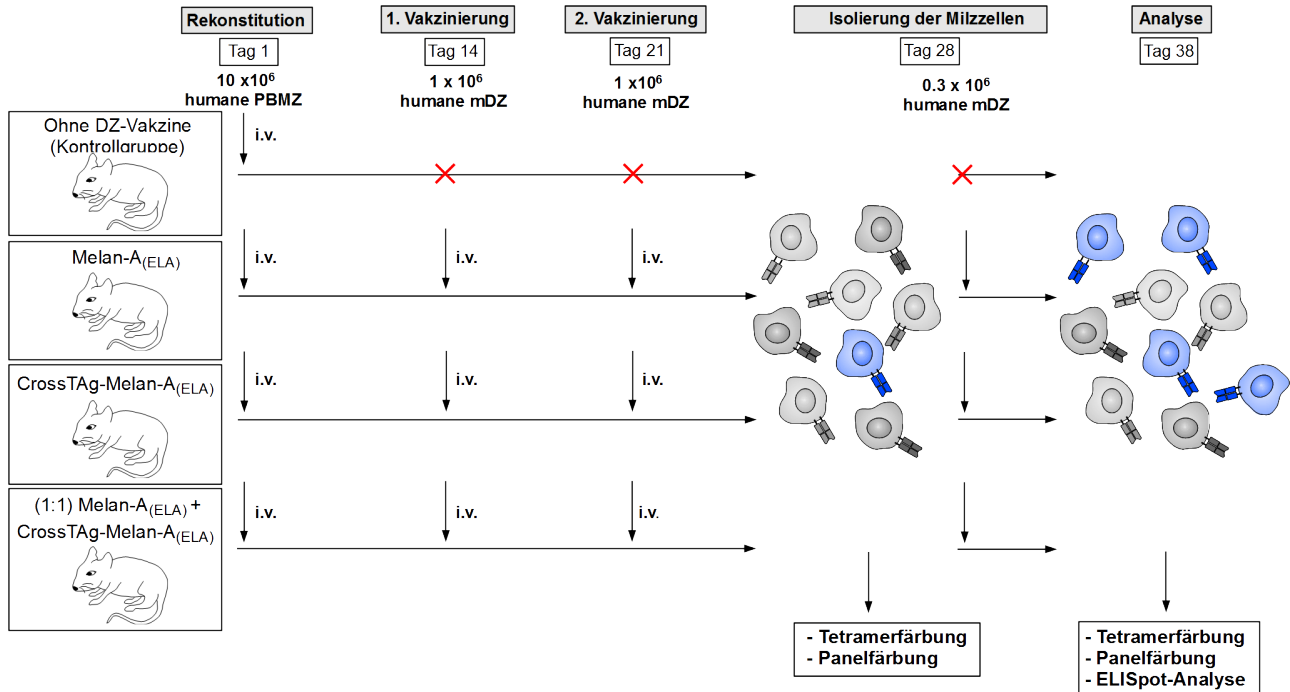


Abb. 4.21: Induktion von Melan-A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in vivo

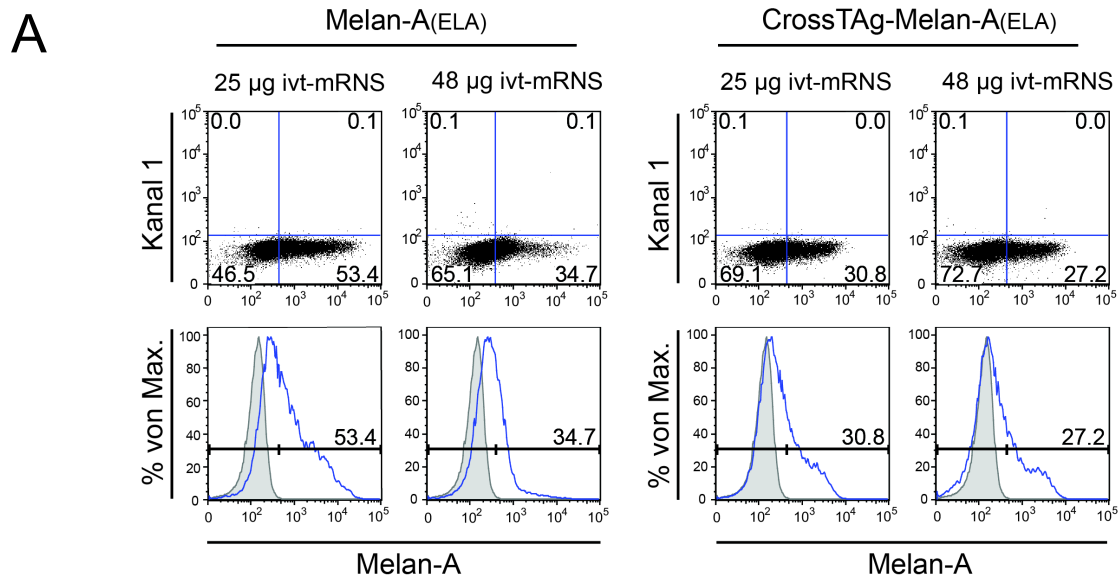
16 NSG-Mäuse wurden in vier Gruppen eingeteilt. Alle Mäuse wurden intravenös (i.v.) mit 10^7 humanen PBMZ rekonstituiert und 14 bzw. 21 Tage später, mit Ausnahme der Kontrollgruppe, mit jeweils 1×10^6 humanen mDZ (mature dendritic cells) vakzinieren. Die mDZ wurden entweder mit Melan-A_(ELA)-ivt-mRNS oder CrossTag-Melan-A_(ELA)-ivt-mRNS transfiziert. Die letzte Gruppe erhielt eine 1:1 Mischung der mit unterschiedlichen ivt-mRNS-Spezies (mit oder ohne CrossTag-Sequenzen) transfizierten mDZ. Die Milzzellen wurden an Tag 28 isoliert, ein Teil davon mittels HLA-A*0201-Melan-A_(ELA)-Tetramer auf Melan-A-spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten untersucht und ein Teil wurde für die Analyse der Zellzusammensetzung verwendet (Panelfärbung). Die restlichen Milzzellen wurden entsprechend den Gruppen mit den jeweiligen DZ (mit oder/und ohne CrossTag-enthaltende Melan-A_(ELA)-ivt-mRNS) in vitro stimuliert und für weitere zehn Tage kultiviert. Zellen der Kontrollgruppe wurden mit ausschließlich 50 U/ml hIL-2 in Kultur gehalten. An Tag 38 erfolgte erneut eine Tetramerverfärbung und Panelfärbung. Die Funktionalität der Melan-A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde anhand des ELISpot untersucht.

4.2.2 Antigenexpression und Stimulationsfähigkeit transfizierter mDZ

Für den Versuchserfolg essentiell war die Expression der transfizierten ivt-mRNS, da andernfalls die T-Zellen nicht oder nur in geringem Maße induziert werden konnten. Um eine Einschätzung der Antigenexpression und der Stimulationsfähigkeit transfizierter DZ zu erhalten, wurde ein Teil der später für die Vakzine verwendeten ivt-mRNS in HLA-A*0201-positive Spender-DZ elektroporiert. Innerhalb von drei Tagen mit Cocktail 6 ausmaturierte DZ wurden somit mit 25 µg oder 48 µg

ivt-mRNS (Melan-A_(ELA)- oder CrossTag-Melan-A_(ELA)-ivt-mRNS) transfiziert. Sechs Stunden nach der Elektroporation wurde intrazellulär das exprimierte Melan-A-Protein mit monoklonalen Antikörpern angefärbt (Abb. 4.22 A). Die Expression beider RNS-Spezies (mit oder ohne CrossTag-Signalsequenzen) unter Verwendung von nur 25 µg ivt-mRNS war überraschenderweise höher als es bei fast doppelt eingesetzter Menge (48 µg ivt-mRNS) der Fall war. In einem zweiten Schritt wurden die transfizierten mDZ mit einem Melan-A-spezifischen HLA-A*0201-restringierten T-Zell-klon 11/33 kokultiviert, um die Stimulationsfähigkeit der jeweiligen DZ zu untersuchen. Als Negativkontrolle wurden mDZ mit 25 µg einer für ein irrelevantes Protein (GFP) codierenden ivt-mRNS transfiziert. Im Gegensatz zu der Expression war die Stimulationsfähigkeit der mit 48 µg ivt-mRNS transfizierten mDZ deutlich besser, was vor allem für die CrossTag-Sequenz-enthaltende ivt-mRNS anhand der freigesetzten IFN-γ-Menge deutlich zu sehen war (Abb. 4.22 B). T-Zellen, die mit 25 µg Melan-A-ivt-mRNS-transfizierten mDZ stimuliert wurden, zeigten keine auf spezifische Aktivierung beruhende Zytokinsekretion, da die detektierte IFN-γ-Menge derjenigen nach Kokultivierung der T-Zellen mit GFP-ivt-mRNS-transfizierten mDZ entsprach. In Abwesenheit von mDZ sezernierten T-Zellen keine detektierbaren IFN-γ-Mengen.

Aufgrund der deutlich verbesserten Stimulationskapazität der mDZ, wenn diese mit doppelt soviel ivt-mRNS transfiziert wurden, wurden im Folgenden die für die Vakzinierungen vorgesehenen mDZ mit 48 µg ivt-mRNS transfiziert.



B

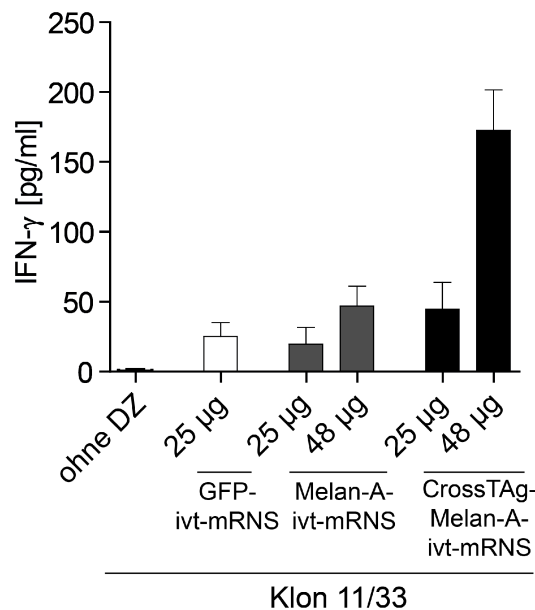


Abb. 4.22: Überprüfung der Antigenexpression und Stimulationsfähigkeit ivt-mRNS-transfizierter DZ
 25 µg oder 48 µg der Melan-A_(ELA)-ivt-mRNS oder CrossTAG-Melan-A_(ELA)-ivt-mRNS wurden in 3d-DZ-Zellen (Spender: MW) transfiziert. **(A)** Sechs Stunden später erfolgte die intrazelluläre Färbung des Melan-A-Proteins mit einem Melan-A-spezifischen monoklonalen Antikörper. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte DZ gefärbt (im Histogramm grau unterlegt). Der DAPI-Farbstoff wurde zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen verwendet. Es wurde keine Färbung mit Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern durchgeführt und somit in Kanal 1 keine Signale gemessen. **(B)** Die Stimulationsfähigkeit der transfizierten DZ wurde mit dem Melan-A-spezifischen, HLA-A*0201-restringierten CD8⁺ T-Zellklon 11/33 im IFN-γ-ELISA überprüft. Als Negativkontrolle fungierten DZ, die mit GFP-ivt-mRNS transfiziert wurden. Dargestellt sind die sezernierten IFN-γ-Mengen nach Kokultivierung der CD8⁺ T-Zellen mit DZ, abzüglich der von den DZ selbst sezernierten Zytokinmengen. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus Messwert-Duplikaten.

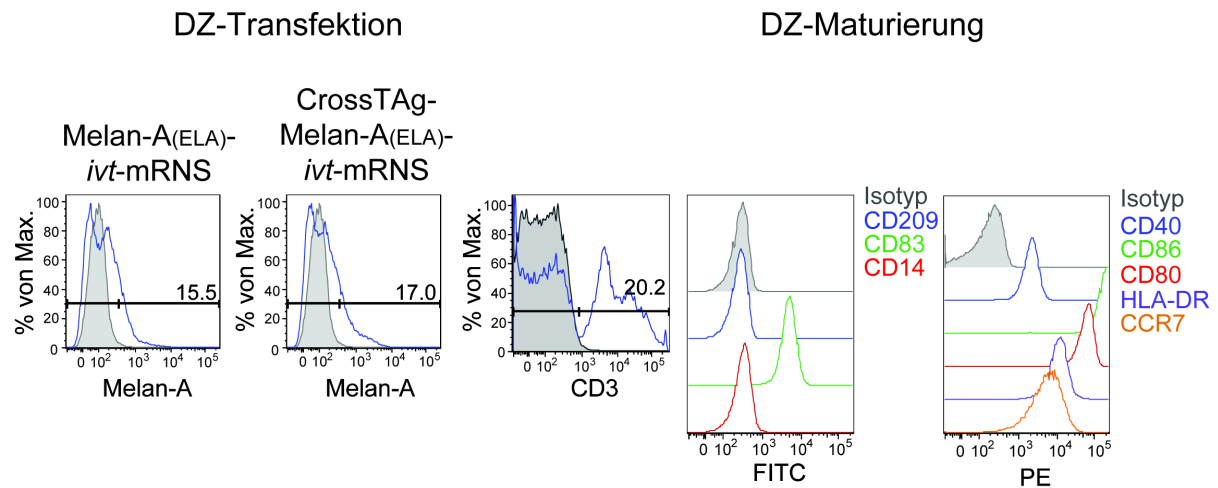
4.2.3 Analyse der Ausgangs-Zellpopulation

An Tag 0 wurden den NSG-Mäusen jeweils 10×10^6 humane PBMZ für die partielle Rekonstitution des defizienten Immunsystems appliziert. Um einen Überblick zu bekommen, welche Zellpopulationen verabreicht wurden und um diese in ihrer Entwicklung nach Rekonstitution in vivo vergleichen zu können, erfolgte eine durchflusszytometrische Quantifizierung der CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen, NK-, NKT- und B-Zellen (Abb. 4.23 A). Wie für einen gesunden Spender zu erwarten war, lagen beinahe doppelt (1,8 x) so viele CD4⁺ wie CD8⁺ T-Zellen vor. Von den CD8⁺ T-Zellen exprimierten 3% den Aktivierungsmarker CD69 und nahezu kein CD25, wobei 2,7% den Chemokinrezeptor CCR7, der wichtig für das Einwandern in sekundäre lymphatische Gewebe (wie z.B. Lymphknoten) ist, auf ihrer Oberfläche trugen. Nur ein sehr geringer Prozentsatz von den CD4⁺ T-Zellen (0,7 %) wiesen das CD69-Molekül auf der Oberfläche auf. B-Zellen machten erwartungsgemäß mit 5,3% einen geringeren Teil der PBMZ aus. Von den rund 26% der CD56-positiven Zellen wiesen etwa 5% den CD4- bzw. 16% den CD8-Korezeptor auf. Der Anteil der NK-Zellen lag demnach bei etwa 5%.



B

1. Vakzinierung



C

2. Vakzinierung

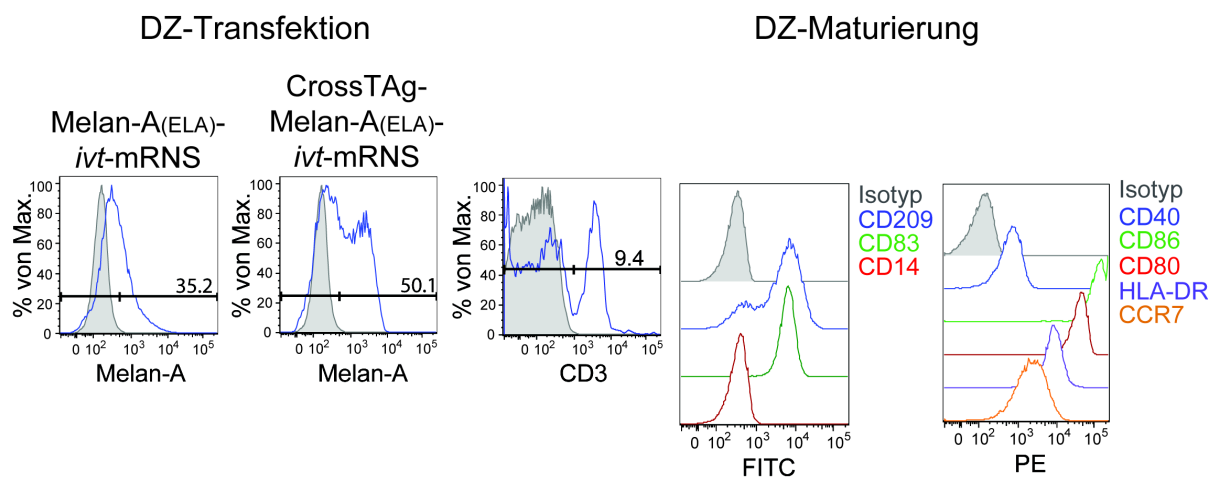


Abb. 4.23: Zusammensetzung der für die Rekonstitution eingesetzten PBMZ und Reifungsanalyse der mDZ. PBMZ und DZ wurden aus Vollblut (Spender: BF) isoliert. Eine FACS-basierte Analyse der Zellpopulationen und des DZ-Maturierungsstatus erfolgte vor Applikation in die NSG-Mäuse. Die dargestellten Zellpopulationen wurden auf lebende Zellen vorselektiert. **(A)** Mittels monoklonaler Antikörper wurden CD4-, CD8-positive T-Zellen, NK-, NKT-Zellen (CD56 und CD4/CD8) sowie B-Zellen (CD19) untersucht. Der Aktivierungsstatus der CD8- bzw. CD4-positiven T-Zellen wurde anhand der Oberflächenmoleküle CD25 und CD69 überprüft. **(B)(C)** Für die am Tag 14 (1.Vakzinierung) und 21 (2.Vakzinierung) stattgefundenen Vakzinierungen, wurden Monozyten mittels Plastikadhärenz von PBL separiert und mit dem Maturierungscocktail C6 innerhalb von drei Tagen ausgereift. Anschließend wurde die erfolgreiche Maturierung anhand verschiedener Oberflächenmoleküle verifiziert (CD14, CD80, CD83, CD86, CD40, CD209, HLA-DR, CCR7). Zur Überprüfung der Reinheit der mDZ wurde die Zellpopulation mit CD3 angefärbt. Die Histogramme zeigen lebende Zellen. Die mDZ wurden vor Applikation mit Melan-A_(ELA)-ivt-mRNS oder CrossTag-Melan-A_(ELA)-A-ivt-mRNS transfiziert und für sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Die Expression wurde sechs Stunden nach Elektroporation mittels intrazellulärer Färbung des Melan-A-Proteins überprüft.

4.2.4 Analyse der Milzpopulation nach zweimaliger DZ-Vakzinierung

Nach der Rekonstitution und zweimaligen Vakzinierung der NSG-Mäuse, wurden die Milzzellen entnommen. Alle weiteren Analysen und Kultivierungsschritte erfolgten *in vitro*. Ein Teil der Milzzellen wurde für die Analyse der Zellzusammensetzung verwendet. Untersucht wurde der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie NKT- und B-Zellen. Zusätzlich wurden CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen bezüglich der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD137 näher betrachtet. In allen Gruppen war generell der Anteil an CD4⁺ T-Zellen deutlich höher als der der CD8⁺ T-Zellen, was der Situation in der PBMZ-Population vor Applikation entsprach (siehe Abb. 4.23 A vor Rekonstitution). In der Kontrollgruppe waren es 2,8-mal mehr CD4⁺ T-Zellen, wohingegen es in den restlichen Gruppen etwas ausgeglichener war und der CD4⁺-Anteil lediglich 1,5 - 1,8-mal höher war (Abb. 4.24 A). Der Aktivierungsstatus der CD8⁺ T-Zellen in den einzelnen Gruppen unterschied sich nicht signifikant voneinander. Zwischen 6,5 – 8,4% der CD8⁺ Zellen exprimierten CD69. Ähnlich verhielt es sich mit dem Aktivierungs-induzierten Oberflächenmolekül CD137 (5,8 - 7,3%). Lediglich CD25 wurde in geringerem Ausmaße von den CD8⁺ T-Zellen hochreguliert (3,0 - 4,2%) (Abb. 4.24 B). Auch die CD4⁺ T-Zellen der einzelnen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich der genannten Aktivierungsmarker. Zwischen 7,6 und 9,5% der Zellen exprimierten CD69, was mit dem CD8⁺ CD69⁺ T-Zellanteil vergleichbar war. Hinsichtlich der von regulatorischen CD4⁺ T-Zellen exprimierten Marker CD137 und CD25 zeigte sich ein inverses Bild zu dem Expressionsmuster der CD8⁺ T-Zellen. D.h. es waren weniger CD4⁺ T-Zellen positiv für CD137 (2,7 – 3,7%) und im Vergleich dazu doppelt so viele Zellen positiv für CD25 (6,3 – 8,7%) (Abb. 4.24 C). Verglichen mit dem verschwindend geringen Prozentsatz an CD4⁺ NKT-Zellen (0,3 – 0,4%) gab es insgesamt in allen Gruppen mehr CD8⁺ NKT-Zellen (1,4 – 3,6%). Somit verringerte sich der Anteil an NKT-Zellen während der Zeit vor der Applikation der PBMZ in die Mäuse bis zur Milzentnahme nach zwei Vakzinierungen sehr stark. Der CD8⁺ NKT-Zellanteil sank von 16% auf unter 4% und der CD4⁺ NKT-Zellanteil von 4% auf unter 0,5% (siehe Abb. 4.23 A vor Rekonstitution). In den Gruppen mit CrossTag-Melan-A_(ELA) und Melan-A_(ELA) + CrossTag-Melan-A_(ELA) konnten jeweils in einer Maus ein stark erhöhter Anteil an CD8⁺ NKT-Zellen beobachtet werden (Abb. 4.24 D). Hinsichtlich des B-Zellanteils konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ausgemacht werden. Abgesehen von den Zellen einer Maus (21,5%) entsprach der B-Zellanteil in der Kontrollgruppe dem Anteil in der Ausgangs-Zellpopulation. In der Melan-A_(ELA)-Gruppe hatte sich die B-Zellpopulation knapp verdoppelt (1,9-mal so viel) (siehe Abb. 4.23 A vor Rekonstitution). In der CrossTag-Melan-A_(ELA)-Gruppe zeichnete sich ein sehr inhomogenes Bild ab. Hier reichte die Spannweite der CD19⁺ Zellen von 2% bis 19,5%. In der Gruppe mit Melan-A_(ELA) + CrossTag-Melan-A_(ELA) glich der Prozentsatz in etwa dem in der Ausgangs-Zellpopulation (durchschnittlich 6,8% mit Ausnahme der Zellen einer Maus) (Abb. 4.24 E).

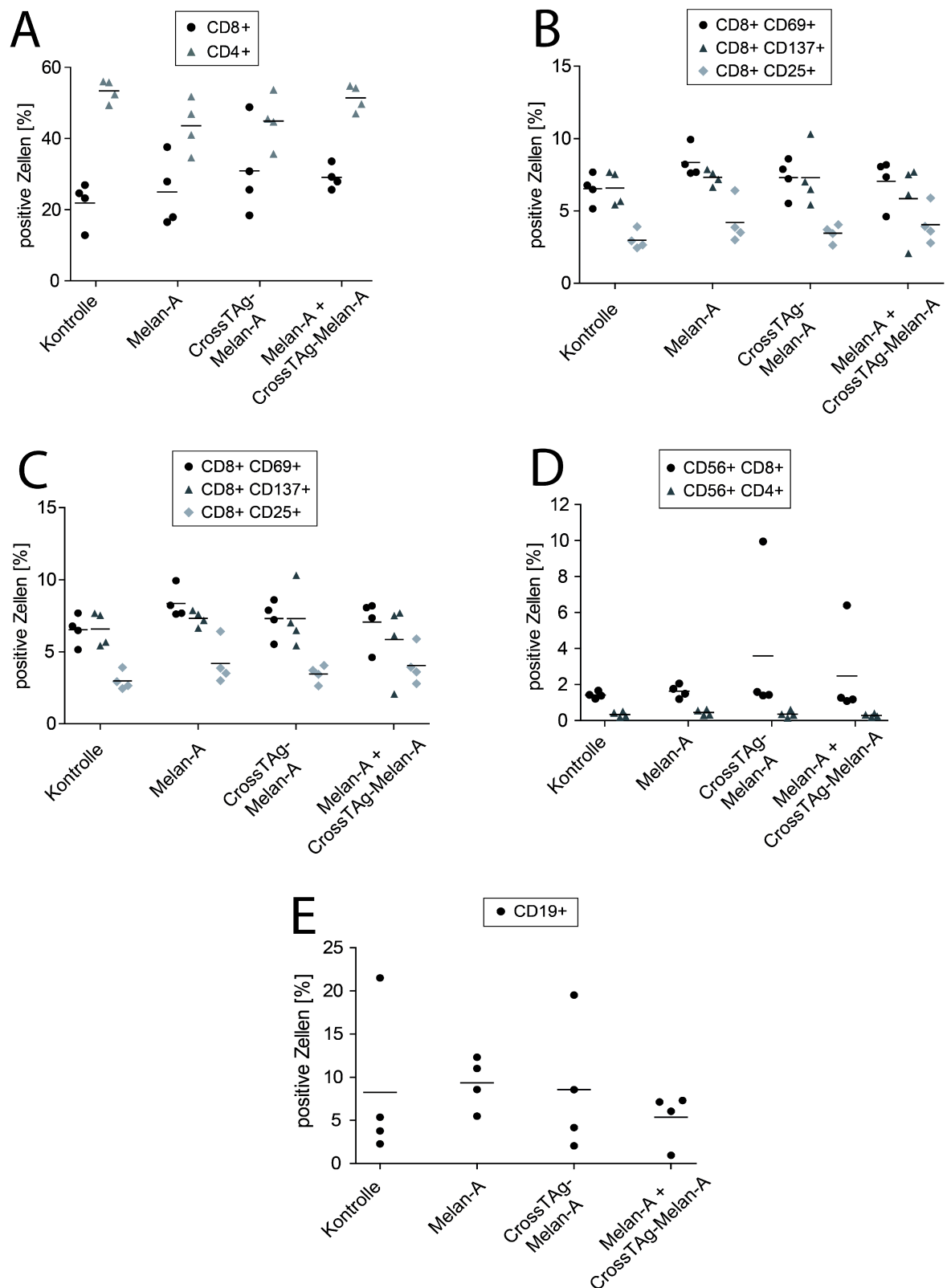
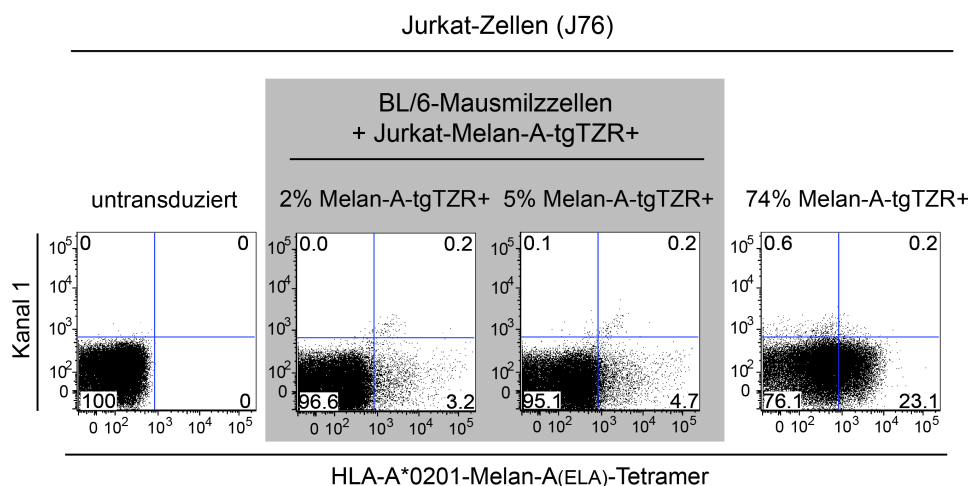


Abb. 4.24: Zusammensetzung der isolierten Milzpopulation

28 Tage nach der Rekonstitution und zweimaliger Vakzinierung mit DZ wurden die Milzzellen präpariert und analysiert. Die PBMZ wurden auf die Zellzusammensetzung und den Aktivierungsstatus der T-Zellen hin untersucht. Hierfür wurden monoklonale Fluoreszenz-konjugierte Antikörpern für die durchflusszytometrische Quantifizierung eingesetzt. Dargestellt sind die einzelnen Gruppen hinsichtlich des prozentualen Anteils an (A) CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen, (B) aktivierten CD8⁺ und (C) CD4⁺ T-Zellen, (D) NKT-, und (E) B-Zellen in der lebenden Milzpopulation.

Des Weiteren wurden die Milzzellen auf Melan-A_(ELA)-spezifische und HLA-A*0201-restringierte CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe des HLA-A*0201-Melan-A-Tetramers hin analysiert. Hierfür wurde zunächst anhand eines Vorversuches untersucht, ob auch geringe Zellzahlen an spezifischen Zellen von den Tetrameren detektiert werden konnten (Abb. 4.25 A). Zu diesem Zweck wurden TZR-negative Jurkat-Zellen (J76) mit einem HLA-A*0201-restringierten, Melan-A_(ELA)-spezifischen TZR transduziert. Anschließend exprimierten 74% der Jurkat-Zellen den transgenen TZR auf der Zelloberfläche. Milzzellen einer BL/6-Maus wurden nun mit 2% oder 5% der Melan-A-TZR-exprimierenden Jurkat-Zellen gemischt und mit dem Melan-A-Tetramer angefärbt. Als Negativkontrolle fungierten untransduzierte Jurkat-Zellen und als Positivkontrolle wurden die transduzierten Jurkat-Zellen (74% Melan-A-TZR⁺) mit dem Tetramer angefärbt. Die Melan-A-TZR⁺-Jurkat-Zellen konnten in dem Gemisch mit BL/6-Milzzellen mit dem Tetramer eindeutig wiedergefunden werden. Sowohl die 2% als auch die 5% Melan-A-TZR⁺-Jurkat-Zellen konnten von den restlichen Milzzellen unterschieden werden. Die Sättigung der eingesetzten Tetramere wurde mit 23% der transduzierten Jurkat-Zellen erreicht (das entsprach in etwa $3,3 \times 10^5$ Zellen), denn 74% der eingesetzten Jurkat-Zellen exprimierten den TZR auf der Oberfläche, aber nur 23% banden an das Tetramer (Abb. 4.25 A). Die Tetramerfärbung der isolierten NSG-Milzzellen zeigte, dass insgesamt nur ein geringer Prozentsatz an Melan-A_(ELA)-spezifischen CD8⁺ T-Zellen detektiert werden konnte. Die Verwendung von CrossTag-verlinkter Melan-A_(ELA)-ivt-mRNS führte, im Vergleich zur Kontrollgruppe, zu einer signifikant stärkeren Anreicherung dieser Zellen. Kein Unterschied konnte zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, in der mDZ mit ivt-mRNS ohne CrossTag-Sequenzen transfiziert waren, beobachtet werden (Abb. 4.25 B und C).

A



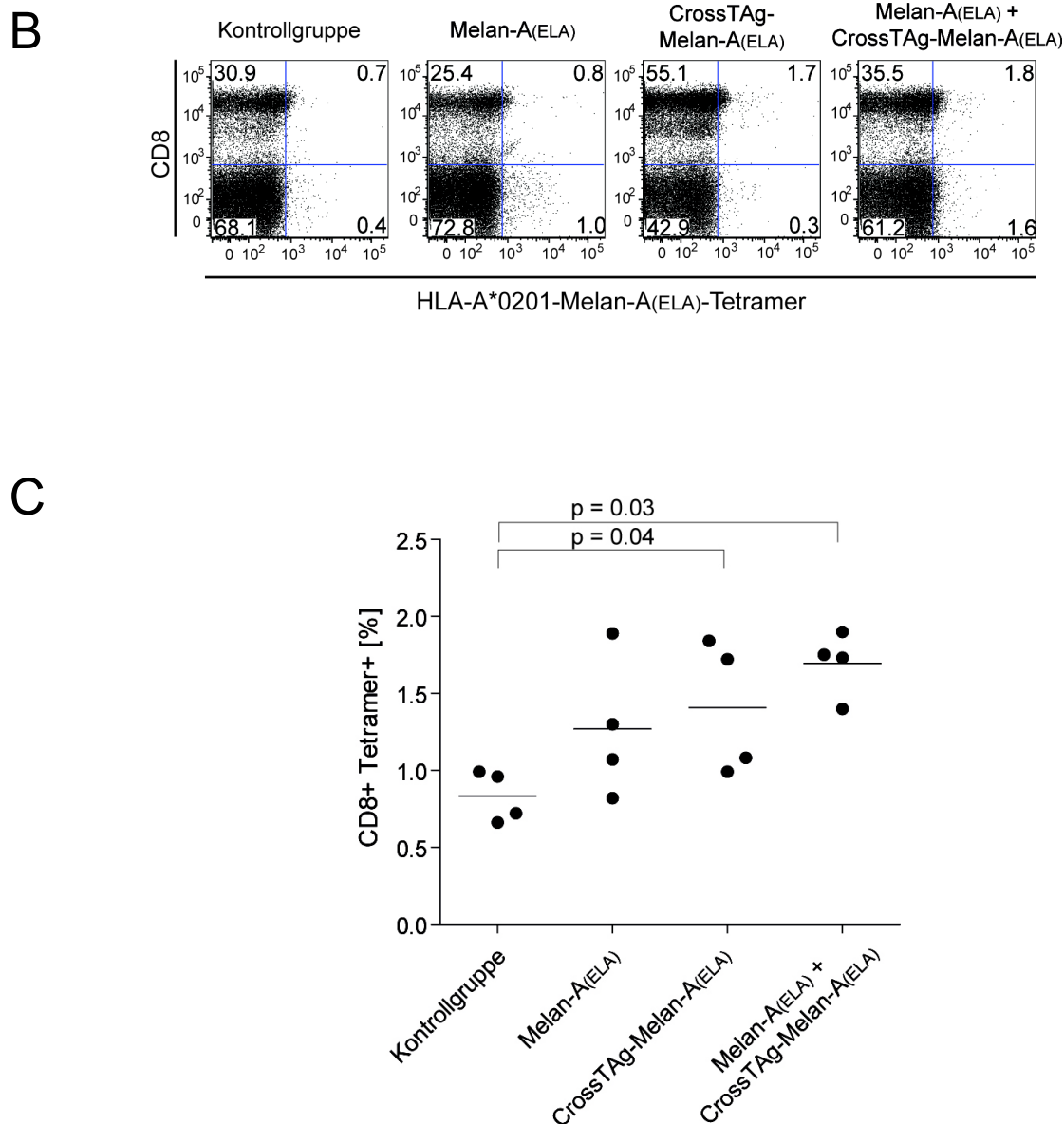


Abb. 4.25: Tetramerfärbung von isolierten Milzzellen

Nach der Isolierung der Milzzellen wurden diese hinsichtlich HLA-A*0201-restringierter, Melan-A-spezifischer CD8⁺ T-Zellen untersucht. **(A)** Jurkat-Zellen (J78), die keinen endogenen TZR exprimierten, wurden mit einem Melan-A-spezifischen, HLA-A*0201-restringierten TZR transduziert. Nach Transduktion exprimierten 74% der Jurkat-Zellen den Melan-A-spezifischen TZR stabil auf ihrer Oberfläche. PBL von BL/6-Mausmilzzellen wurden mit 2% oder 5% Melan-A-TZR⁺-Jurkat-Zellen gemischt und mit dem HLA-A*0201-Melan-A_(ELA)-Tetramer inkubiert. Als Negativkontrolle fungierten nicht transduzierte Jurkat-Zellen. Zusätzlich wurden die zu 74% Melan-A-TZR-exprimierende Jurkatpopulation mit dem Tetramer inkubiert. Der prozentuale Anteil der Tetramer-positiven Zellen ist in den rechten Quadranten angegeben. Es wurde keine Färbung mit Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern durchgeführt und somit in Kanal 1 keine Signale gemessen. **(B)** Die isolierten PBMZ der vier Gruppen wurden mit dem HLA-A*0201-Melan-A_(ELA)-Tetramer und mit einem monoklonalen CD8-Antikörper angefärbt. Die gezeigten Populationen waren auf einzelne, lebende Lymphozyten vorselektiert. Aus jeder Gruppe ist ein Beispiel als Streu-Diagramm dargestellt und in **(C)** zusammengefasst. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests.

4.2.5 Analyse der in vitro restimulierten Milzzellen

Die frisch isolierten Milzzellen wurden mit den, für die jeweiligen Gruppen entsprechenden DZ restimuliert und zwei Tag danach mit hIL-2 in vitro kultiviert. Die Kontrollgruppe erhielt statt der DZ nur hIL-2, um das Überleben der humanen PBMZ zu sichern. Zehn Tage nach der Restimulation wurden die überlebenden Zellen erneut auf ihre Zusammensetzung hin analysiert. Des Weiteren wurde die Tetramerfärbung wiederholt und eine funktionale Analysen über spezifische Zytokinsekernierung durchgeführt.

4.2.5.1 Zellzusammensetzung und Melan-A_(ELA)-Spezifität humaner PBMZ nach Kultivierung

Nach der zehntägigen Kultivierung wurde untersucht, ob während dieser Zeit eine Veränderung in der Zellzusammensetzung stattgefunden hatte. Daher wurde anhand spezifischer Oberflächenmarker der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, CD8⁺ NKT-Zellen und B-Zellen ausgewertet. Für den besseren Vergleich wurden in Abb. 4.26 die prozentual angegebenen Zellpopulationen sowohl für den Tag der Milzisolierung als auch nach Kultivierung dargestellt. Der Anteil an CD8⁺ T-Zellen blieb zwischen den beiden Zeitpunkten unverändert (20 – 30% lebende Zellen) und auch zwischen den Gruppen war kein Unterschied erkennbar (Abb. 4.26 A). Die Zahl der CD4⁺ T-Zellen stieg tendenziell an, war jedoch nicht signifikant erhöht. Das CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellverhältnis blieb dabei konstant bei etwa 2:1 (Abb. 4.26 B). CD8⁺ NKT-Zellen verdoppelten sich in der Gruppe mit Melan-A_(ELA)-ivt-mRNS-transfizierten mDZ und in der Gruppe mit den CrossTag-Melan-A_(ELA)-ivt-mRNS-transfizierten mDZ. In der Kontrollgruppe vervierfachte sich die Population sogar. Ausschließlich in der gemischten Gruppe blieb der Anteil konstant bei etwa 2,5% (Abb. 4.26 C). Der prozentuale Anteil an B-Zellen ist während der Kultivierung stark gesunken und machte je nach Gruppe nur noch zwischen 1,5 und 3,6% der Lymphozytenpopulation aus (Abb. 4.26 D).

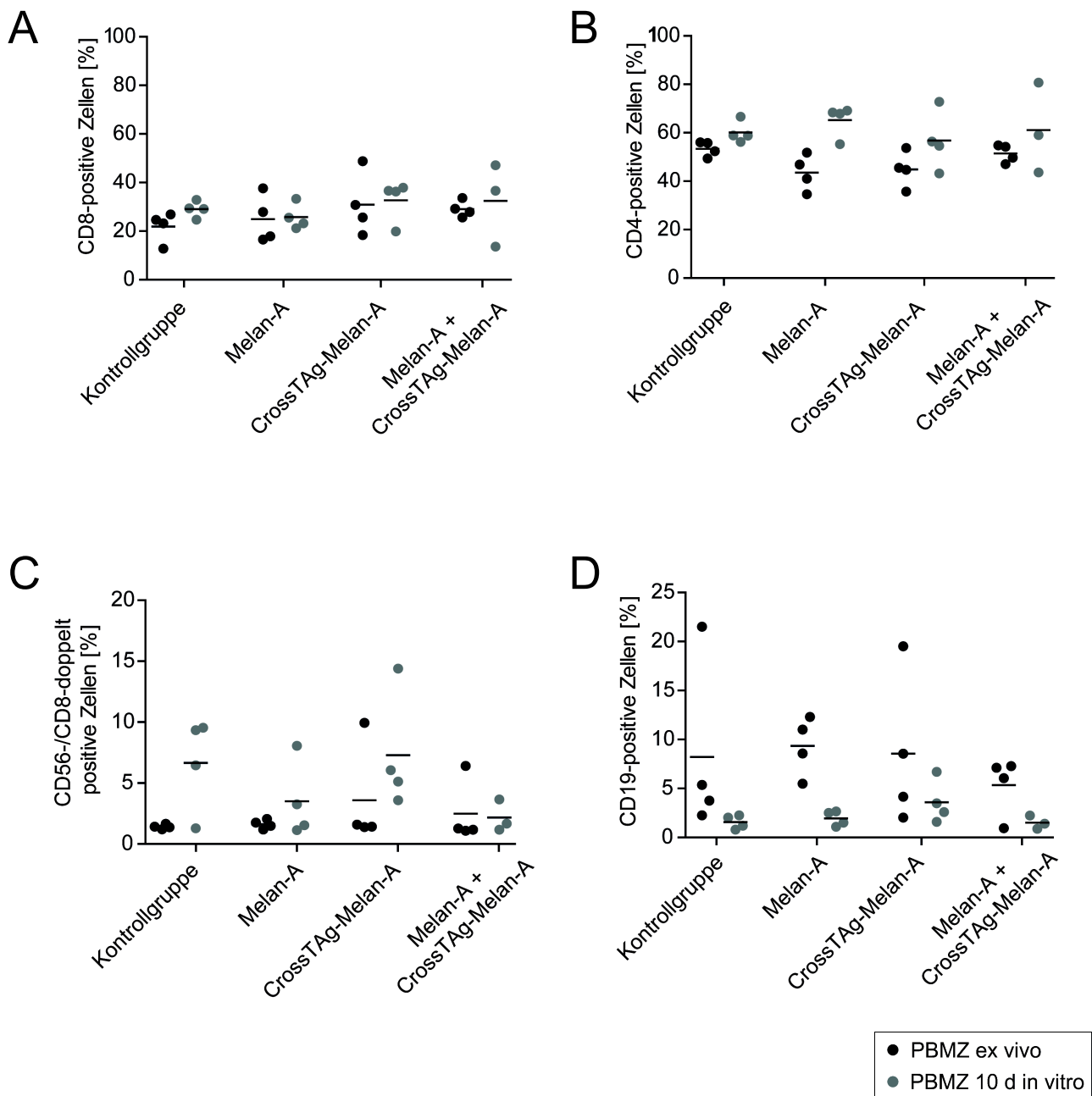


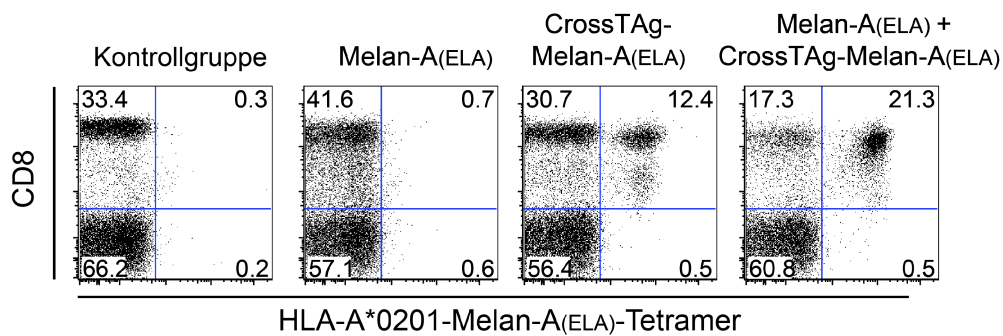
Abb. 4.26: Zellzusammensetzung kultivierter Milzzellen

Nach Isolierung der Milzzellen wurden diese mit den für die Gruppen entsprechend transfizierten DZ restimuliert. Zwei Tage nach Restimulation, wurden die Kulturen mit 50 U/ml hIL-2 versetzt. Die Kontrollgruppe erhielt zur weiteren Kultivierung ausschließlich 50 U/ml hIL-2. Zehn Tage später wurden die Milzzellen auf ihre Zellzusammensetzung hin analysiert. Im Diagramm dargestellt sind die einzelnen Gruppen hinsichtlich des prozentualen Anteils an **(A)** CD8⁺, **(B)** CD4⁺ T-Zellen, **(C)** CD56/CD8/CD4 und **(D)** CD19-positiven Zellen in der jeweiligen lebenden Lymphozytenpopulation.

Die Tetramerfärbung der Melan-A_(ELA)-spezifischen, HLA-A*0201-restringierten CD8⁺ T-Zellen wurde ebenfalls nach der Kultivierung wiederholt. In Abb. 4.27 A ist aus jeder Gruppe ein Streudiagramm als Beispiel aufgeführt. Es konnte eine deutlich abgesetzte Melan-A_(ELA)-spezifische CD8⁺ T-Zellpopulation in den beiden Gruppen beobachtet werden, deren mDZ mit

CrossTAG-gekoppelter ivt-mRNS transfiziert wurden (gemischte Gruppe und Cross-TAG-Melan-A_(ELA)-Gruppe). Die CrossTAG-Melan-A_(ELA)-Gruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant höheren Anteil an spezifischen T-Zellen (Abb. 4.27 B). Die gemischte Gruppe zeigte ebenfalls sehr viel mehr spezifische Zellen als die Kontrollgruppe oder die Gruppe, die ohne CrossTAG-gekoppeltes Melan-A stimuliert wurde. In der Kontrollgruppe und Melan-A_(ELA)-Gruppe lag der prozentuale Anteil spezifischer Zellen bei unter 1%, bei den übrigen Gruppen hingegen bei durchschnittlich 8,5% (CrossTAG-Melan-A_(ELA)) bzw. 12% (Melan-A + CrossTAG-Melan-A_(ELA)).

A



B

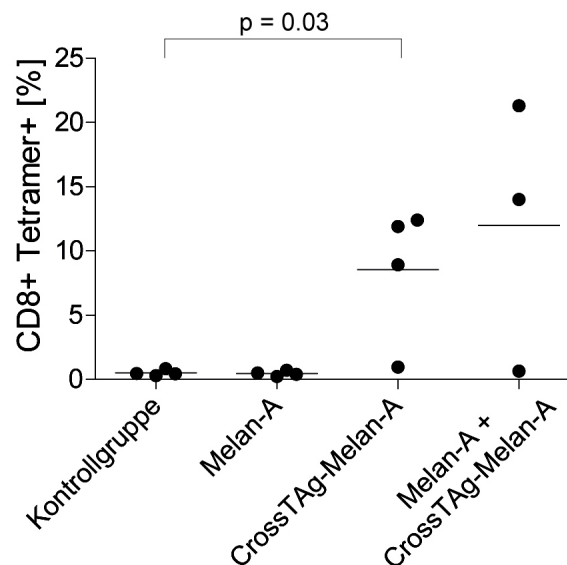


Abb. 4.27: Tetramerfärbung kultivierter Milzzellen

Zehn Tage nach der In-vitro-Restimulation wurden die PBL mit dem HLA-A*0201-Melan-A_(ELA)-Tetramer und mit monoklonalen CD8-Antikörpern angefärbt. **(A)** Aus jeder Gruppe ist ein Beispiel als Streu-Diagramm dargestellt. Die gezeigten Populationen waren auf einzelne, lebende Lymphozyten vorselektiert. Der Prozentsatz an CD8-, Tetramer-doppeltpositiven T-Zellen ist im rechten oberen Quadranten ersichtlich. Alle Färbungen wurden in **(B)** zusammengefasst. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests.

4.2.5.2 Funktionsanalyse Melan-A-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Die bisher gezeigten Ergebnisse beschrieben die Verteilung der Melan-A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, abhängig von der Stimulation. Dies ließ jedoch keine Aussage über die Funktionalität der spezifischen T-Zellen zu. Daher wurde weiterhin untersucht, ob die induzierten T-Zellen in der Lage waren, als Antwort auf die Stimulation die für die Immunantwort und Proliferation wichtigen Zytokine, wie z.B. IFN- γ , zu sekretieren. Dies wurde anhand der sehr sensitiven ELISpot-Methode analysiert. Die Milzzellen wurden im Verhältnis 1:1 mit den Zielzellen gemischt und über Nacht auf der beschichteten ELISpot-Platte inkubiert. Drei unterschiedliche Zielzellen wurden herangezogen: Die Tumorzelllinie K562 (negativ für HLA-Moleküle) wurde eingesetzt, um die NK-Zellaktivität zu ermitteln. Als Negativkontrolle für Melan-A-spezifische T-Zellen fungierte die Melanomzelllinie MelA375 (Melan-A-negativ, HLA-A*0201-positiv) und als Stimulationszellen die Mel624.38 (Melan-A-positiv, HLA-A*0201-positiv). Es konnte keine NK-Zellaktivität beobachtet werden. Unstimulierte Milzzellen und die Kokultivierung mit MelA375 führte ebenfalls zu keiner Aktivierung der T-Zellen. Des Weiteren wurden nur Melan-A-spezifische CD8⁺ T-Zellen aus der CrossTAg-Melan-A_(ELA)- bzw. gemischten Gruppe zur IFN- γ -Sekretion angeregt. Eine signifikant stärkere spezifische Aktivierung der T-Zellen nach Kokultivierung mit Mel624.38 im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte in den Gruppen, die mit CrossTAg-ivt-mRNS induziert wurden, beobachtet werden (CrossTAg-Melan-A_(ELA)-Gruppe: $p=0,03$; Melan-A_(ELA) + CrossTAg-Melan-A_(ELA)-Gruppe: $p=0,05$). Hingegen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Melan-A-Gruppe (ohne CrossTAg) festgestellt werden ($p=0,08$) (Abb. 4.28 A).

Die Melan-A-Expression wurde anhand der intrazellulären Färbung des Proteins bestätigt. Nahezu alle Mel624.38-Zellen (94%) exprimierten das Zielantigen. Mit einem an alle HLA-Klasse-I-bindenden Antikörper (pan-MHC-I) wurde die Expression auf der Zelloberfläche nachgewiesen (100%). Weiterhin stellte sich die Frage, ob die beobachtete Zytokinsekretion von CD8⁺ T-Zellen oder zytotoxischen CD4⁺ T-Zellen stammte. In der Literatur ist beschrieben, dass die Melanomzelllinie Mel624.38 negativ für HLA-DR ist (Zeng, G. et al., 2000). Um zu klären, ob ein anderes HLA-Klasse-II-Molekül auf der Oberfläche exprimiert wurde, wurden die Zielzellen mit einem Antikörper angefärbt, der alle HLA-Klasse-II-Moleküle (pan-MHC-II) binden konnte. Die Zellen wurden als negativ für HLA-Klasse-II getestet, weshalb das beobachtete, sezernierte IFN- γ von CD8⁺ T-Zellen stammen musste.

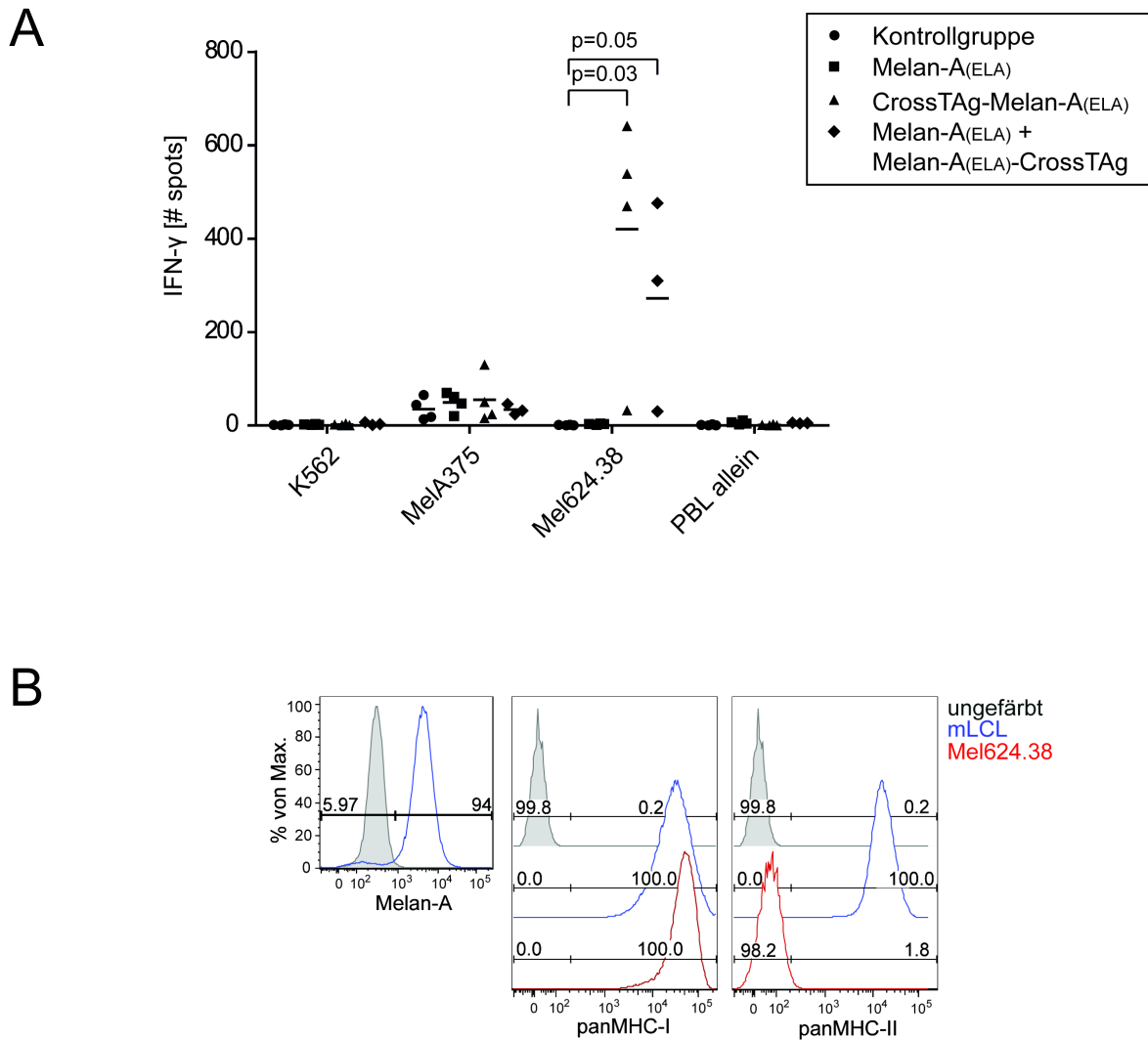


Abb. 4.28: Funktionalität Melan-A-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

(A) Die Reaktivität der Melan-A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde elf Tage nach In-vitro-Restimulation der humanen PBL mittels ELISpot-Test überprüft. Es wurden jeweils 4×10^4 PBL mit genauso vielen Targetzellen für 24 Stunden auf einer IFN- γ -beschichteten 96-Loch-ELISpot-Platte inkubiert. Als Zielzellen fungierte die HLA-negative Tumorzelllinie K562 sowie die Melanomzelllinien MelA375 (Melan-A-negativ, HLA-A*0201-positiv) und Mel624.38 (Melan-A-positiv, HLA-A*0201-positiv). Die Auswertung der IFN- γ -Punkte erfolgte mit Hilfe eines ELISpot-Lesegerätes (C.T.L.). Jeder der im Diagramm dargestellten Datenpunkte repräsentiert den Mittelwert aus zwei Messwerten (Duplikate). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test. **(B)** Mittels intrazellulärer Färbung wurde die Melan-A-Expression in der Melanomzelllinie Mel624.38 überprüft. Als Negativkontrolle fungierte die Melanomzelllinie MelA375 (Melan-A-negativ, grau). Die MHC-I bzw. -II Expression auf der Zelloberfläche wurde mit panMHC-I bzw. -II-Antikörpern analysiert. Als Negativ(ungefärbt)- und Positivkontrolle fungierten mLCL (grau und blau). Die dargestellten Histogramme wurden auf lebende Zellen vorselektiert.

5 DISKUSSION

In dieser Arbeit standen zwei Ansatzpunkte zu tumortherapeutischen Zwecken im Mittelpunkt – der adoptive T-Zelltransfer und die Vakzinierung mit dendritischen Zellen (DZ). Zum einen wurde eine Methodik etabliert, mit der Tumor-Testis-Antigen (TTA)-spezifische CD8⁺ T-Zellen ungeachtet der MHC-I-Restriktion und Epitopspezifität de novo induziert und isoliert werden konnten, um für den therapeutischen adoptiven T-Zelltransfer einsetzbare TZR zu generieren. Zum anderen wurde in vivo untersucht, ob die Vakzinierung mit DZ, die sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen induzieren konnten, gegenüber den DZ, die nur die CD8⁺ T-Zellpopulation spezifisch aktivierten, einen Vorteil aufwies. Beiden Ansätzen zu Grunde lagen die an die Zielantigene fusionierten Transport-/Sortierungsproteine LAMP-1 und DC-LAMP, wodurch die Antigene auf MHC-I und -II präsentiert werden konnten (Wu et al., 1995; Bonehill et al., 2004; Ellinger, 2013).

Die Ergebnisse werden im Zusammenhang der aktuellen Forschung im Folgenden beleuchtet und diskutiert.

5.1 De-novo-Induktion Tumor-Testis-Antigen (TTA)-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in vitro

Zunächst wurde in vitro eine Methodik etabliert, anhand derer unter Einsatz von CrossTAG-gekoppelter 5-TTA-ivt-mRNS Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen in PBL de novo induziert werden konnten. Dabei wurden einige Aspekte im Vergleich zu bisher durchgeführten Ansätzen zur Steigerung der Effizienz verändert: Anstelle von CD8⁺ T-Zellen wurden gesamte PBL eingesetzt, die nicht nur gegen ein Antigen, sondern gegen fünf verschiedenen TTA induziert wurden. Die Präsentation der Peptidepitope konnte auf mehreren verschiedenen allogenen MHC-I-Allelen sowie durch den Einsatz des CrossTAG-Konstruktes auch auf MHC-II-Allelen stattfinden.

5.1.1 Aufbau des In-vitro-Kokulturansatzes

Der methodische Ansatz basierte auf den neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen hinsichtlich einer effektiven, in unserer Arbeitsgruppe routinemäßig durchgeführten DZ-Generierung, T-Zell-Kultivierung und -Induktion sowie weiteren relevanten Aspekten und wird nachstehend näher erläutert.

Für die Generierung von TTA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in einem in vitro Ansatz wurden ausgereifte DZ eingesetzt. Sie gelten als die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen, den B-Zellen und Makrophagen überlegen, und können Tumorantigen-spezifische T-Zellen aus einem

naiven Repertoire sowie Gedächtnis-T-Zellen aktivieren (Ho et al., 2006; Andrews et al., 2008; Steinman, 2012). So wurden für die Stimulation der TTA-spezifischen T-Zellen Monozyten innerhalb von drei Tagen zu reifen DZ (3-Tage-mDZ) ausgereift, da gezeigt wurde, dass diese sog. „fast“ mDZ gegenüber denen, die üblicherweise innerhalb von sieben Tagen ausmaturiert werden, einige Vorteile aufweisen: sie zeichnen sich vor allem durch eine höhere Migrationskapazität aus und können naive T-Zellen effizienter stimulieren. Außerdem überleben sie die Prozedur der Elektroporation besser, die zur Transfektion der mDZ mit ivt-mRNS durchgeführt wird und sind robuster als die 7-Tage-mDZ, was die Kryopräservierung betrifft. CD274 (PD-L1), das durch Bindung an CD279 (PD-1) auf T-Zellen zu deren Inhibition führt, wird von 3-Tage-mDZ in geringerem Maße, das kostimulatorische Molekül CD80 dagegen verstärkt exprimiert. Zudem gestaltet sich die Maturierung durch das verkürzte Ausreifungsprotokoll kostengünstiger, da weniger Zytokine eingesetzt werden müssen (Dauer et al., 2005; Ho et al., 2006; Burdek et al., 2010). Bekanntermaßen ist IL-12(p70) essentiell für eine Th1-polarisierte Immunantwort und die Einleitung einer Tumorantigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellantwort (Trinchieri, 2003). Daher wurden die iDZ mit Cocktail 6 (siehe Material und Methoden 3.1.10) ausmaturiert, der sowohl TLR3- als auch TLR7/8- Agonisten (PolyI:C und R848) enthielt, denn unter Verwendung der beiden Komponenten sekretieren mDZ größere Mengen an bioaktivem IL-12(p70) und es wird auch ein höherer Prozentsatz an T-Zellen, die IFN- γ sekretieren, induziert (Larange et al., 2009; Spranger et al., 2010).

Die Präsentation von Tumorantigenen durch die mDZ kann auf unterschiedliche Weise erreicht werden. Eine Möglichkeit ist die Tumor-Peptid-Beladung von außen, wobei hierfür allerdings die immunogenen Epitope der Antigene sowie die Bindungsfähigkeit an das jeweilige MHC-Molekül bekannt sein müssen. Dabei wird automatisch das Peptidepitop sowie die MHC-I-Restriktion von vornherein festgelegt und neue immunogene Epitope auf alternativen MHC-I-Molekülen bleiben unberücksichtigt. Weiterer Nachteile der Peptidbeladung sind zum einen die relativ kurze Präsentationsdauer, da die Peptide nach kurzer Zeit bereits wieder von der Bindungsgrube dissoziieren. Zum anderen fehlen posttranslationale Modifikationen der Peptidepitope (Gilboa, 1999; Wang, R. F. et al., 1999; Aarntzen et al., 2012).

Die Transfektion von DZ mit DNA birgt ebenfalls einige Schwierigkeiten. So könnte man zwar das gesamte Gen des Zielantigens in die Zellen einbringen, allerdings gestaltet sich die Transfektion schwierig. Nicht-virale Transfektionsmöglichkeiten wie Elektroporation und Liposomen-vermittelte Transfektion resultieren in einer sehr geringen Effizienz. Eine der besten Möglichkeiten ist die Transfektion mit einem 33-Aminosäure langen kationischen Peptid (CL22), wodurch die Transfektionseffizienz auf 17% gesteigert werden konnte, was dennoch gering ist (Zhou, Y. et al., 2002). Die Virus-vermittelte Transfektion beschränkt sich bei DZ auf z.B. lentivirale Vektoren, da die Zellen nicht stark proliferieren, was jedoch eine Voraussetzung für eine effiziente Transfektion mit retroviralen Vektoren darstellt. Generell bergen in das Wirtsgenom integrierende virale Vektoren

eine Gefahr hinsichtlich des transformierenden Potenzials (Ribas et al., 2002; Vari und Hart, 2004). Eine effektive Alternative für die Beladung von MHC-I-Molekülen in DZ stellt die Transfektion mit Antigen-ivt-mRNS dar. Hierbei können mehrere verschiedene Peptidepitope, unabhängig vom genetischen Hintergrund des Spenders, auf unterschiedliche MHC-I-Moleküle geladen werden. Ein weiterer Vorteil der ivt-mRNS ist die transiente Expression des transfizierten Antigens, wodurch potentiell gefährliche Antigene in der Anwendung für immuntherapeutische Zwecke (z.B. DZ-Vakzination) keine Gefahr darstellen, da sie nicht stabil in das Zellgenom integriert werden und nach einer bestimmten Zeit vollständig degradiert werden (Javorovic et al., 2008). Die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen konnte mit Hilfe dieser Methode von verschiedenen Gruppen *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. Erste Versuche zur Transfektion von Antigen-ivt-mRNS mittels Elektroporation wurden im Jahre 2000 gestartet und diese Methode wird mittlerweile standardgemäß auch in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich durchgeführt (Boczkowski et al., 1996; Strobel et al., 2000; Wilde et al., 2009).

Um die Präsentation von Peptiden nicht nur auf MHC-I-Moleküle zu beschränken, sondern auch auf MHC-II-Moleküle zu ermöglichen, wurde die Antigen-DNS im verwendeten Vektor von Signalsequenzen von LAMP-1 und DC-LAMP flankiert und in ivt-mRNS umgeschrieben. Dadurch wurden die transfizierten DZ befähigt, eine im Vergleich zur natürlichen Kreuzpräsentation verstärkte CD4⁺ T-Zellantwort auszulösen (Ellinger, 2013). Aus Gründen der effizienteren Expression erfolgte die Transfektion der mDZ mit jeweils immer nur einem TTA, wobei insgesamt aber gegen fünf verschiedene TTA eine CD8⁺ T-Zellantwort generiert werden sollte. Um zu vermeiden, dass die simultane Transfektion der verschiedenen RNS-Spezies zu einer gegenseitigen Blockierung oder Überladung der mDZ führt, wurde jedes Antigen in eine Teilfraktion der mDZ transfiziert, welche anschließend wieder gemischt wurden (Javorovic et al., 2008). Die erfolgreiche Transfektion konnte mit spezifischen Primern für die gewählten Kandidaten-TTA GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO-1 und XAGE-1 auf mRNS-Ebene gezeigt werden (Abb. 4.5).

Der parallele Einsatz von mehreren Antigenen für die De-novo-Induktion birgt einige Vorteile. Zum einen ist bislang noch weitgehend unbekannt, welche der potentiellen Tumor-assoziierten Antigene tatsächlich immunogen sind. Durch Verwendung mehrerer Antigene steigt die Chance, TZR zu induzieren, die gegen ein stark immunogenes Antigen gerichtet sind. Des Weiteren wurde in den 90ern gezeigt, dass die Immunogenität vom genetischen Hintergrund des jeweiligen Probanden abhängt (z.B. MHC-Allele), wodurch diese stark variieren kann (Sette et al., 1994; van der Burg et al., 1996). Dies gilt auch für die Epitope, die von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden können. Indem die gesamte codierende Sequenz der TTA für die Transfektion eingesetzt wurde, unterliegen die präsentierten Epitope einer natürlichen Selektion durch die spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Zudem könnten neue immunogene Epitope in Kombination mit verschiedenen MHC-I-Allelen identifiziert werden.

Da mit Hilfe der Signalsequenzen auch eine CD4⁺ T-Zellhilfe für die CD8⁺ T-Zellen mobilisiert

werden konnte (Ellinger, 2013), wurden nicht CD8⁺ angereicherte T-Zellen de novo induziert, wie es bisher in unserer Arbeitsgruppe üblich war, sondern die gesamte PBL-Population mit transfizierten mDZ kokultiviert, um einen synergistischen Effekt zwischen den Subpopulationen zu ermöglichen. Das durch die Interaktion und das Zusammenspiel der einzelnen Zellpopulationen entstandene Zytokinmilieu und die gegenseitige Aktivierung kam somit einer physiologischen Immunreaktion näher.

Nicht zuletzt galt es den Umstand zu umgehen, dass TTA meist Selbst-Antigene sind, gegen die das T-Zellrepertoire im Thymus eine negative Selektion erfährt oder in der Peripherie negativ reguliert wird, um Autoimmunität zu verhindern. Für einige der TTA (z.B. XAGE-1a) wurde bereits beschrieben, dass sie im Thymus exprimiert werden. Daher war davon auszugehen, dass auch T-Zellen, die einen hoch-affinen TZR für TTA:Selbst-MHC-Moleküle exprimierten, die negative Selektion durchlaufen haben (Gotter et al., 2004; Scanlan et al., 2004; Wilde et al., 2009). Das bedeutet wiederum, dass nur T-Zellen übrig bleiben, die mit einem niedrig-affinen TZR Selbst-Antigene im Selbst-MHC-Kontext erkennen können. Für den adoptiven T-Zelltransfer bzw. eine effiziente Tumorthherapie ist es jedoch notwendig, einen hoch-affinen TZR einzusetzen, um fortschreitendes Tumorwachstum zu verhindern (Rosenberg et al., 2008). Bereits 1998 verwiesen Obst et al. auf die Möglichkeit der Generierung hoch-avider CD8⁺ T-Zellen gegen Selbst-Antigene, indem man diese in einen allogenen, also für die T-Zellen fremden, MHC-I-Kontext stellt (Obst et al., 1998). Der etablierte semi-allogene De-novo-Induktionsansatz von Wilde et al. beschränkte sich auf ein allogenes MHC-I-Allel (HLA-A*0201) das zusätzlich mit dem Zielantigen in Form von ivt-mRNS in mDZ transfiziert wurde (Wilde et al., 2009). Für die endogenen MHC-I-Allele galt dennoch die Selbst-Antigen:Selbst-MHC-Konstellation, gegen die niedrig avide T-Zellen zu erwarten waren. Dieser semi-allogene Ansatz wurde in dieser Arbeit erweitert, indem nicht länger nur ein Allo-MHC-I-Allel transgen in DZ eingebracht wurde, sondern die Präsentation auf mehrere verschiedene MHC-Allele ausgeweitet wurde, indem sich DZ- und PBL-Spender in fünf der sechs MHC-I-Allele unterschieden (Multi-allogener De-novo-Induktionsansatz). Somit wurde eine Selbst-Antigen:Fremd-MHC-Situation für vier MHC-I-Loci geschaffen (aufgrund der Homozygotie für den HLA-A-Lokus des DZ-Spenders).

5.1.2 Durchführung der De-novo-Induktion und CD137-Sortierung

Vor Beginn der De-novo-Induktion wurde die Verteilung der einzelnen Subpopulationen (Abb. 4.6) der PBL analysiert und mit Referenzwerten aus der Literatur verglichen. Sie bewegte sich hinsichtlich des CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellanteils bei einem gesunden, männlichen Spender von unter 50 Jahren im Normbereich. Insgesamt war der T-Lymphozytenanteil (CD3⁺) zwar leicht erhöht (Normbereich: 63,9 – 84,6%; Spender: 85,8%), jedoch entsprach das CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellverhältnis dem

Durchschnittswert (1,7). Der Anteil an CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen rangierte ebenfalls innerhalb der zu erwartenden Werte. Während der geringe Anteil an Monozyten und B-Zellen aufgrund der zuvor durchgeführten Plastikadhärenz zu erklären ist, befand sich der NK-Zellanteil ebenfalls unterhalb der Normgrenze (Normbereich: 5,6 – 20,16%; Spender: 2,8%) (Bisset et al., 2004).

Ho et al. berichteten eine verbesserte Proliferation und Anreicherung Antigen-spezifischer T-Zellen, wenn die Zytokine IL-2 und IL-7 verzögert zur Kokultur zugesetzt wurden. Daher wurden diese Zytokine zwei Tage nach der Kokultivierung der PBL mit TTA-transfizierten mDZ der Kultur zugesetzt. Bis zur Restimulation nach 14 Tagen wurde in regelmäßigen Abständen von zwei bis drei Tagen altes Kulturmedium gegen frisches, mit IL-2 und IL-7 supplementiertes, Medium ausgetauscht (Ho et al., 2006). Die Probefärbung der CD8⁺ T-Zellen 13 Tage nach der Kokultivierung ergab, dass sich das anfängliche CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellverhältnis von 1,7 hin zu Gunsten der CD8⁺ auf 0,5 umkehrte. Zudem exprimierten rund 40% der CD8⁺ T-Zellen den Aktivierungsmarker CD137 (4-1BB) auf ihrer Oberfläche. Diese beiden Beobachtungen ließen darauf schließen, dass ein für die CD8⁺ T-Zellen unterstützendes Milieu in der PBL-Kultur vorherrschte, da eine massive Proliferation eingetreten war und ein großer Anteil der Zellen Antigen-spezifisch reagierte (Abb. 4.7).

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten multi-allogenen Induktionsansatz ist es unvermeidlich, dass auch T-Zellen generiert wurden, die das fremde MHC-I-Molekül unabhängig von dem gewünschten Zielpeptid erkannten (Nagy, 2012). Da die eingesetzten mDZ mehrere fremde-MHC-Moleküle präsentierten und damit zusätzliche Zielstrukturen für die T-Zellen lieferten als nur die eingebrachten Tumor-Testis-Antigene, war die Gefahr gegeben, dass allo-reaktive Zellen die TTA-spezifischen T-Zellen überwuchsen und damit die Frequenz der erwünschten TTA-spezifischen Zellen stark sank bzw. die Sortierung erschwerten (Floyd et al., 2010). Wie in Abb. 4.7 zu sehen, machten die TTA-unabhängig aktivierten CD8⁺ T-Zellen (Kokultur mit Kontroll-elektroporierten mDZ) 13 Tage nach De-novo-Induktion bereits ein Drittel (33%) der CD137-positiven CD8⁺ T-Zellen aus. Um zu verhindern, dass dieser unspezifisch aktivierte Zellanteil nach einer weiteren Stimulationsrunde stark zunahm, wurde die PBL-Kultur nur einmal restimuliert, bevor die Sortierung hinsichtlich der spezifisch aktivierten, CD137-exprimierenden CD8⁺ T-Zellen erfolgte.

CD137 wurde aufgrund seiner beschriebenen Eigenschaft als Aktivierungs-induzierter Oberflächenmarker für die Sortierung verwendet, da er von CD8⁺ T-Zellen hochreguliert wird, sobald diese ein Stimulationssignal über den TZR erhalten (Miller, R. E. et al., 2002; Wolf et al., 2007). Da jedoch auch allo-reaktive T-Zellen über den TZR stimuliert werden und infolge auch CD137 hochregulieren, gab es keine Möglichkeit, schon bei der Klonierung der Zellen die für eine T-Zelltherapie ungeeigneten allo-reaktiven T-Zellen heraus zu filtern (Wehler et al., 2007).

Die Sortierung der TTA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde 12 Stunden nach Restimulation durchgeführt, da nach dieser Zeit, wie gezeigt, bei einem 1:1 Verhältnis von T-Zellen zu APZ die maximale Expression von CD137 erreicht wurde (Abb. 4.3 A). Zwar wurden für die Sortierung jeweils 1×10^6 PBL mit nur $2,5 \times 10^5$ transfizierten mDZ kokultiviert, bedenkt man aber, dass von den PBL

nur 56% CD8⁺ T-Zellen ausmachten, lag etwa ein Verhältnis von 2:1 von spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu transfizierten mDZ vor, was die Sortierung nach 12 Stunden rechtfertigte. Ähnliche Ergebnisse zur CD137-Expressionskinetik wurden von Watanabe et al. berichtet, die feststellten, dass CD137 auf T-Zellen 16 Stunden nach Peptidstimulation das Expressionsmaximum erreichte (Watanabe et al., 2008).

Neben der Selektion spezifisch aktivierter T-Zellen sprach die beschriebene positive Wirkung auf Proliferation, Zytokinproduktion, zytotoxische T-Lymphozyten-Aktivität und Zellüberleben nach Bindung an den Rezeptorliganden CD137L (4-1BBL) für die Verwendung des Markers CD137 (Wang et al., 2003; Vinay und Kwon, 2012). Zwar zeigte der für die Sortierung verwendete Anti-CD137-Antikörper keinen stimulatorischen Effekt auf den CD8⁺ T-Zellklon IVSB, aber andererseits auch keine inhibitorische Wirkung auf die Zellproliferation (Daten nicht gezeigt). Vermutlich band der Antikörper an einen nicht zur Kostimulation führenden Bereich des CD137-Moleküls. Somit erhielten die T-Zellklone erst nach Zugabe des Stimulationsgemisches, das TTA-ivt-mRNS-transfizierte mLCL sowie bestrahlte PBL von vier verschiedenen Spendern enthielt, die nötige Kostimulation über CD137L, denn es konnte auch gezeigt werden, dass z.B. B-Zellen, DZ und Makrophagen den Liganden exprimieren (Wang et al., 2003; Lee et al., 2012; Park et al., 2012). Allogene mLCL wurden als Stimulatorzellen alternativ zu mDZ verwendet, da diese nicht limitierend in der Zellzahl waren und ebenso wichtige kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 exprimierten (Moosmann et al., 2002). Die T-Zellen wurden in 96-Loch-Rundbodenplatten sortiert, wobei entweder eine, drei oder sechs Zellen pro Kavität verteilt wurden, da nicht vorherzusehen war, wie hoch die Frequenz an TTA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sein würde.

Die Beobachtung, dass spezifisch aktivierte T-Zellen den Korezeptor CD8 herunterregulieren wird im Zusammenhang mit der IFN-Typ-I-abhängigen Antwort von CD8⁺ T-Zellen als Schutzmechanismus vor überschießender Reaktivität und daraus resultierenden Gewebeschäden während der Immunantwort gegen eine virale oder bakterielle Infektion diskutiert (Xiao et al., 2007). Damit übereinstimmend wurde ein Zusammenhang zwischen der CD8-Expression, dem IL-7 Signalweg und der TZR-Affinität beobachtet. Dementsprechend ist die Rede von „*coreceptor tuning*“: T-Zellen mit einem niedrig-affinen TZR regulieren die CD8-Expression in Anwesenheit von IL-7 hoch, wodurch die Bindung des TZR an seinen Liganden (Selbst-Peptid) erhöht und damit das TZR-Signal verstärkt wird. Im umgekehrten Fall sind T-Zellen mit einem hoch-affinen TZR weniger sensitiv gegenüber IL-7, wodurch die CD8-Expression herunterreguliert wird und das TZR-Signal geringer ist (Park, J. H. et al., 2007). Auch die zu sortierenden PBL zeigten eine Teilpopulation, die geringere Mengen an CD8-Korezeptoren auf ihrer Oberfläche aufwiesen (CD8^{low}, Abb. 4.8). Möglicherweise handelte es sich hierbei ebenfalls um CD8⁺ T-Zellen, die einen hoch-affinen TZR aufwiesen und nach DZ-Stimulation CD8 herunterregulierten. Da die CD8^{low} Population nicht separat untersucht bzw. mit den CD8^{high} verglichen wurde, lassen sich keine Rückschlüsse auf die TZR-Affinität ziehen.

5.1.3 Identifizierung TTA-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone

Auf klonaler Ebene wurden die T-Zellen mit bestrahlten PBL, zusammengesetzt aus vier verschiedenen Spendern, TTA-transfizierten allo genen mLCL und entweder mit PHA oder mit Anti-CD3/-CD28 restimuliert. Zusätzlich wurde das Restimulationsgemisch aller Platten mit den Zytokinen IL-2 und IL-15 versetzt, da mehrfach beschrieben wurde, dass diese beiden Zytokine wichtig für die Generierung und den Erhalt von CD8-Gedächtniszellen, den Zellzyklus, die Entwicklung von Zytotoxizität und matura n T-Zellen sowie die Herunterregulierung von inhibitorischen Rezeptoren auf CD8⁺ T-Zellen (z.B. CD127 und CD44) sind. Die Bindung von IL-2 führt zur Heterodimerisierung der zytoplasmatischen Domäne der beiden IL-2-Rezeptorketten β und γ_c , woraufhin drei verschiedene Signalwege in der T-Zelle aktiviert werden (PI3-K/AKT, Ras-MAPK und JAK-STAT). Dies führt u.a. zu Zell-Wachstum, -Überleben und -Differenzierung (Schluns et al., 2002; Sandau et al., 2010; Liao et al., 2011; McCaughy et al., 2012; West et al., 2013). Weiterhin zeigte die Kultivierung des IVSB-Klons mit IL-2 oder IL-15 eine 4-fach verbesserte Proliferationsrate in Anwesenheit von IL-15, ungeachtet von weiteren Stimulatorzellen oder Agenzien (Daten nicht gezeigt).

Bereits zwei Wochen nach der Sortierung konnten die ersten expandierten T-Zellklone auf TTA-Spezifität getestet werden. Insgesamt wurden über 658 proliferierende Klone, verteilt auf 22 96-Loch-Rundbodenplatten, untersucht. Die erste Reihenuntersuchung wurde mit TTA-transfizierten allo genen mDZ durchgeführt, wobei Kontroll-elektroporierte mDZ als Negativkontrolle fungierten. Es zeigten sich vier verschiedene Reaktionsmuster: Neben den nicht-reaktiven T-Zellen (12,2%), die keinerlei IFN- γ nach Stimulation sezernierten, wurden allo-reaktive T-Zellen isoliert, die unabhängig von TTA aktiviert wurden (TTA-unspezifisch; 70,2%) (Abb. 4.10 A und B). Die als partiell TTA-abhängig bezeichneten T-Zellen (15,7%) erkannten, wie eine weiterführende Untersuchung mit separat transfizierten mLCL pro Antigen ergab, neben ihrem spezifischen TTA vermutlich ein allo genes MHC-Molekül oder die Spezifität für ein von den mLCL exprimiertes Antigen. Denn die beobachtete Hintergrundreaktivität richtete sich unabhängig vom transfizierten Antigen gegen alle mLCL (Abb. 4.11 B). Diese Hintergrundreaktivität konnte nicht durch die endogene Expression des Zielantigens in den mLCL ausgelöst worden sein, da eine Expressionsanalyse auf mRNS-Ebene ergab, dass die betreffenden mLCL keine der relevanten TTA-Transkripte aufwiesen (Abb. 4.12). So wurden zwei partiell TTA-abhängige Klone identifiziert, die MAGE-A4 (M227) bzw. SSX4 (M500) als spezifisches Antigen erkannten (Abb. 4.11 B). Eine Kreuzreaktivität gegen ein mLCL-spezifisches Antigen ist ebenfalls unwahrscheinlich, da die selben T-Zellklone auch mit DZ als APZ diese Hintergrundreaktivität aufwiesen. Möglicherweise war der TZR dieser T-Zellklone spezifisch für ein anderes Antigen und kreuzreaktiv zu den Tumor-Testis-Antigenen. Diese Annahme stützt sich auf den Mechanismus der molekularen Mimikry, wodurch beispielsweise T-Zellen, die spezifisch für ein fremdes Antigen sind, kreuzreaktiv gegen Selbst-Antigene reagieren können (Fujinami et al., 2006; D'Orsogna et al., 2012).

Nicht zuletzt konnten einige TTA-spezifische T-Zellen (2,0 %) identifiziert werden, die keine oder eine sehr geringe unspezifische Reaktivität zeigten (Abb. 4.10 B). In einer weiteren Analyse konnten GAGE-1- und NY-ESO-1-spezifische T-Zellklone (M399 und M395) identifiziert werden (Abb. 4.11 A).

Wie in Tab. 5 dargestellt, konnte für jedes Zielantigen mindestens ein spezifischer T-Zellklon identifiziert werden. Im Gegensatz zu einem De-novo-Induktionsansatz, bei dem nur ein Zielantigen eingesetzt wird, können mit der hier gezeigten Methode TZR mit unterschiedlichen Spezifitäten gleichzeitig induziert und isoliert werden.

Tab. 5: Übersicht der analysierten T-Zellklone

Einteilung der T-Zellen in Gruppen	Prozentualer Anteil (Anzahl der Klone)	Identifizierte TTA-Spezifitäten (Anzahl der Klone)
Nicht-reaktive T-Zellklone	12,2 % (80)	-
TTA-unspezifische T-Zellklone	70,2 % (462)	-
Partiell TTA-abhängige T-Zellklone	15,7 % (103)	GAGE-1 (2), MAGE-A4 (2), SSX4 (1)
TTA-spezifische T-Zellklone	2,0 % (13)	NY-ESO-1 (1), GAGE-1 (2), XAGE-1 (1)

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die T-Zellklone nicht hinsichtlich ihrer Restriktion untersucht werden, weshalb kein Rückschluss auf unterschiedliche allogene MHC-I-Restriktionen gezogen werden konnte.

5.1.4 Hintergründe der Problematik der Expansion von CD8⁺ T-Zellklonen

Insgesamt war es schwierig, TTA-spezifische Zellen zu detektieren, da ein grundsätzliches Problem der CD8⁺ T-Zellkultivierung die Expansion und der Erhalt der Reaktivität auf klonaler Ebene darstellten und daher der Umfang an Untersuchungen mit den Originalklonen stark limitiert war. Geht man von dem Ergebnis der ersten Reihenuntersuchung aus, wurden etwa 13 TTA-spezifische Klone isoliert (2 % aller analysierten Klone). Angesichts der Schwierigkeiten in der Kultivierung und Expansion der Klone, sind die Gründe für eine relativ geringe Spezifitätsrate eher in den genannten Punkten zu suchen, da vermutlich einige spezifische T-Zellklone für eine Untersuchung nicht ausreichend expandiert werden konnten. Ein negativer Effekt der CrossTAg-Sequenzen auf die Proliferation der CD8⁺ T-Zellklone konnte ausgeschlossen werden, da ein eher synergistischer und positiver Effekt der CD4⁺ T-Zellhilfe auf die Proliferationsfähigkeit der CD8⁺ T-Zellen vor der Klonierung zu beobachten war. Des Weiteren ergab sich die gleiche Problematik der CD8⁺ T-Zellkultivierung auf klonaler Ebene in einem vorangegangenen De-novo-Induktionsansatz, der mit acht

verschiedenen TTA und zwei Tumor-assoziierten Antigenen als Zielantigene ohne die CrossTag-Sequenzen durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt).

Nach Separation der CD8⁺ T-Zellen von den restlichen in der PBL-Population enthaltenen Zellen, konnten die TTA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für maximal weitere vier Wochen auf klonaler Ebene expandiert werden, bevor sie entweder anerg wurden oder starben. Die Frage war also, warum die T-Zellen vor der Klonierung proliferierten, nach Separation jedoch eine weitere Kultivierung über einen längeren Zeitraum nicht möglich war, obwohl die Zellen im 2-wöchigen Abstand restimuliert wurden. Hier könnte eine Vielfalt von Ursachen zu Grunde gelegen haben. Beispielsweise wurde beschrieben, dass aktivierte B-Zellen das inhibitorische Molekül PD-1, nach Stimulation mittels Anti-IgM-Antikörper, hochregulieren (Agata et al., 1996; Thibult et al., 2013). T-Zellen, die diesen Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, unterlaufen nach Bindung an dessen Liganden (PD-L1) den programmierten Zelltod oder verlieren ihre Funktionalität hinsichtlich Zytokinproduktion, Proliferation und Zytotoxizität. Dem Konzept der Trogozytose folgend, das die Übertragung von Oberflächenmolekülen von der APZ auf die Effektorzelle während der Interaktion beschreibt, ist es grundsätzlich möglich, dass Mini-LCL (mLCL, EBV-immortalisierte B-Zellen) ihren inhibitorischen Rezeptor PD-1 auf die CD8⁺ T-Zellen übertragen, wenn diese ihr spezifisches Antigen auf dem MHC-I-Komplex der mLCL erkannt hat (Bhadra et al., 2011; Gary et al., 2012; Thibult et al., 2013). Durch die Bindung des PD-1 Rezeptors an seinen Liganden werden SH2-Domänen-enthaltene Tyrosinase-Phosphatasen zu dem ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) des zytoplasmatischen Teils des PD-1 Rezeptors rekrutiert, wodurch die TZR-Signalweiterleitung über PI3K/AKT-Signalweg in den T-Zellen inhibiert wird (Crespo et al., 2013). In Übereinstimmung damit exprimierte eine Teilpopulation (22%) der als Stimulatorzellen eingesetzten mLCL PD-1 auf der Oberfläche (Daten nicht gezeigt) und es konnte eine verminderte Reaktivität der CD8⁺ T-Zellen nach spezifischer Restimulation im Anschluss an eine 4-wöchige Kultivierung auf klonaler Ebene im ELISA beobachtet werden.

Eine einfachere Variante, wie CD8⁺ T-Zellen PD-1-Moleküle auf der Zelloberfläche erhalten, ist die beschriebene Induktion der PD-1-Expression nach PHA- oder Anti-CD3-Antikörper-Stimulation. Unstimuliert exprimierten nur 15-18% der peripheren T-Zellen PD-1, wohingegen 48 Stunden nach Anti-CD3-Behandlung bereits 25-30%, und nach 72 Stunden sogar 35-45% der T-Zellen PD-1 auf der Oberfläche trugen. Im Falle von PHA kristallisierte sich dieser Effekt noch stärker heraus, denn nach 48 Stunden konnte auf 80-84% der T-Zellen PD-1 nachgewiesen werden (Saunders et al., 2005).

Die wiederholte Antigen-vermittelte Stimulation der CD8⁺ T-Zellen kann ebenfalls zum sog. Aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation induced cell death*, AICD) führen. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Vakzinierung mit persistierender Antigenpräsenz in Mäusen zur Deletion, Dysfunktion und zum Absterben der T-Zellen führt. Dabei wird IFN- γ - und Fas-Ligand-vermittelte Apoptose eingeleitet (Hailemichael et al., 2013). Die wiederholte Stimulation mit Antigen-

beladenen DZ kann ebenfalls zur Deletion hoch-affiner T-Zellen durch AICD führen (Ho et al., 2006). Aus diesem Grund wurde bei der klonalen Expansion in dieser Arbeit darauf verzichtet, wiederholt mit DZ zu stimulieren, sondern es wurden stattdessen mLCL eingesetzt. Allerdings ist es grundsätzlich denkbar, dass auch Antigen-beladene mLCL bei CD8⁺ T-Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg AICD induzieren können.

Ebenfalls vorstellbar, aber für die hier beschriebenen T-Zellklone eher unwahrscheinlich, ist der sog. Brudermord (*fratricide*). Dabei handelt es sich um CD8⁺ T-Zellen, die das für ihren TZR spezifische Zielantigen und das MHC-I-Restriktionselement endogen exprimieren, so dass die T-Zellen die TZR-Zielstrukturen auf den benachbarten „Bruder-“ Zellen erkennen und sich schlussendlich aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaften gegenseitig umbringen. Ein beschriebenes Beispiel ist der HLA-A*0201-restringierte TZR, der spezifisch das Tumor-assoziierte Antigen Survivin erkennt. Unsere Arbeitsgruppe fand heraus, dass die Transduktion dieses Rezeptors in aktivierte HLA-A*0201-positive PBL einen massiven Zelltod zur Folge hatte, da die Lymphozyten Survivin nach Aktivierung endogen exprimierten (Leisegang et al., 2010; Schendel und Frankenberger, 2013). Da es sich in dieser Arbeit um einen multi-allogenen Induktionsansatz handelte, erkannten die meisten CD8⁺ T-Zellen Tumor-Testis-Antigene in Kombination mit einem fremden MHC-I-Allel, das sie selbst nicht exprimierten. Somit wäre aufgrund des fehlenden MHC-Restriktionselements auf den T-Zellen kein Brudermord möglich, selbst wenn diese das TTA endogen exprimierten. Eine Ausnahme bildeten CD8⁺ T-Zellen, die einen HLA-B*1501 restringierten TZR exprimierten, denn dieses Allel hatten PBL- und APZ-Spender gemeinsam (autologe Situation) (Abb. 4.1 B). Außerdem können TZR, aufgrund ihrer Kreuzreaktivität, zwei oder mehr Peptid-MHC-Komplexe erkennen. Somit ist es grundsätzlich möglich, dass T-Zellen mit einem TTA-spezifischen, allo-MHC-I-restringierten TZR kreuzreaktiv zu einem Antigen sind, das auf einem MHC-I-Allel der „Bruder-“Zelle präsentiert wurde (Petrova et al., 2012).

Daneben wird immer häufiger die Wichtigkeit der CD4⁺ T-Zellhilfe für eine erfolgreiche CD8⁺ Gedächtniszellentwicklung beschrieben. Dies wäre eine weitere mögliche Erklärung für die Sterblichkeitsrate der T-Zellklone, da nach Sortierung die CD8⁺ T-Zellklone von den TTA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen getrennt wurden und dies möglicherweise kritisch für die von der T-Zellhilfe abhängigen CD8⁺ T-Zellen gewesen ist. Zwar befanden sich in dem Restimulationsgemisch für die T-Zellklone PHA-/Anti-CD3-aktivierte PBL, die auch CD4⁺ T-Zellen enthielten, allerdings wurde beschrieben, dass für eine Aktivierung von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellhilfe essentiell ist, wohingegen Effektor-T-Zellen unabhängig von der T-Zellhilfe agieren können (Gao et al., 2002). Wurden während des Induktionsansatzes dank der CD4⁺ T-Zellhilfe CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen ausgebildet, waren diese womöglich auf die Anwesenheit von Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen angewiesen. So wäre eine unspezifische, PHA-/Anti-CD3-vermittelte Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen u.U. für das Überleben der CD8⁺ T-Zellklone nicht ausreichend.

Die Interaktion und Bedeutung des Zusammenspiels der beiden T-Zellsubpopulationen wird in ei-

nem späteren Kapitel genauer diskutiert (siehe Kapitel 5.4).

5.1.5 Testsystem zur Charakterisierung TTA-spezifischer TZR

Wie bereits erwähnt, konnten die CD8⁺ T-Zellklone nur für einen kurzen Zeitraum *in vitro* kultiviert und daher nur in geringem Umfang funktionelle Spezifitätstests mit diesen Klonen durchgeführt werden. Um die möglicherweise therapeutisch wertvollen TTA-spezifischen TZR nicht mit den absterbenden T-Zellklonen zu verlieren, wurde eine alternative Methode gesucht, mit der die Eigenschaften der TZR weiter verfolgt werden konnten. Da Wilde et al. nachweisen konnten, dass die Charakteristika von den ursprünglichen zytotoxischen T-Zellklonen via TZR-Gentransfer auf PBL übertragbar sind (Wilde et al., 2012), war der Transfer der TTA-spezifischen TZR in geeignete Rezipientenzellen eine mögliche Option.

Wie in Kapitel 4.1.6.1 dargestellt, bot die TZR-Bibliothek eine kostengünstige und einfache Möglichkeit, jeden beliebigen TZR zu rekonstruieren und transgen in geeignete Effektor-T-Zellen einzubringen. Da der Verlust der T-Zellklone nicht abzuwenden war, konnten somit Dank der TZR-Bibliothek die TTA-spezifischen TZR für weitere Analysen bewahrt werden.

Für eine zeitsparende Bestätigung der TTA-Spezifität, wurden die TZR nicht stabil über retrovirale Vektoren in z.B. PBL transduziert, sondern als Alternative transient über ivt-mRNS in Rezipientenzellen transfiziert (Sommermeyer et al., 2006; Thomas et al., 2010). Im Falle des adoptiven T-Zelltransfers gilt beispielsweise die Transfektion eines tgTZR in PBL mittels ivt-mRNS als eine sichere Variante, da ivt-mRNS nach einiger Zeit wieder degradiert wird und nicht, wie z.B. virale Vektoren, in das Wirtsgenom integriert wird. Sollte es zu unerwünschten toxischen Nebenwirkungen kommen, sind diese mit der Lebensdauer der transfizierten ivt-mRNS zeitlich limitiert (Zhang und Morgan, 2012; Essand und Loskog, 2013).

Verschiedene Strategien verfolgen das Ziel einer verbesserten transgenen TZR-Expression. Um eine effizientere Expression zu erreichen, wurden die in dieser Arbeit isolierten TZR-Sequenzen, vor Klonierung in einen für die Synthese von ivt-mRNS vorgesehenen Vektor, codonoptimiert. Weiterhin wurden Sequenzen aus der Maus für den konstanten Teil der TZR- α - und β -Kette verwendet, um die Wahrscheinlichkeit einer Fehlpaarung zwischen endogenen und transgenen TZR-Ketten zu minimieren und den Anteil an korrekt gepaarten transgenen TZR-Ketten zu erhöhen (Govers et al., 2010). Auf der Suche nach geeigneten TZR-Rezipientenzellen wurden folgende Kriterien aufgestellt:

- leicht und schnell zu expandierende Zellen
- Expression des CD8⁺ Korezeptors, falls die transgenen TZR CD8-abhängig waren
- erfolgreiche Expression des transgenen TZR

- ausreichende Zytokinsekretion nach spezifischer Stimulation über den transgenen TZR
- keine unspezifische Zytokinsekretion
- u.U. bekannte Restriktion und Epitoperkennung des endogenen Rezeptors

Zu diesem Zweck wurden zunächst Jurkat-76-IVB10-Zellen als Rezipientenzellen in Betracht gezogen, die von Maja Bürdek aus Subpopulationen von Jurkat-76 (erhalten von M. Heemskerk) isoliert worden waren. Diese Jurkat-Zellen exprimierten keinen endogenen TZR mehr und bargen somit nicht die Gefahr einer Fehlpaarung. Außerdem waren sie schnell und einfach zu expandieren (Bürdek, 2009). Allerdings stellte sich heraus, dass die Verifizierung der Funktionalität des transgenen (tg)TZR aufgrund fehlender Zytokinsekretion nicht möglich war (Daten nicht gezeigt).

Alternativ konnten etablierte CD8⁺ T-Zellklone unter geeigneten Elektroporationsbedingungen mit tgTZR erfolgreich transfiziert werden. Vorteile der Verwendung von etablierten T-Zellklonen ist die bekannte Restriktion und Spezifität, die Expression des CD8-Korezeptors sowie die bekannten Bedingungen für eine erfolgreiche Expansion. In Frage kam daher der JB4-T-Zellklon (isoliert von B. Mosetter in der Arbeitsgruppe von D.J. Schendel), der spezifisch HLA-A*0201 erkannte (Milani et al., 2005). Dieser wurde mit dem Kontrollrezeptor TZR-EBNA-1 (generiert von S. Milosevic) transfiziert, der sein spezifisches Epitop „HPVGEADYFEY“ auf HLA-B*3502 erkannte. Selbst bei einem geringen Prozentsatz an tgTZR-EBNA-1-positiven JB4-T-Zellen konnte für ein eindeutiges Ergebnis ausreichende Zytokinmengen detektiert werden (Abb. 4.14 A und B). Limitiert war dieses System allerdings auf tgTZR, die nicht HLA-A*0201-restringiert waren, denn sonst müssten HLA-A*0201-positive APZ eingesetzt werden, die allerdings den endogenen TZR stimulieren würden. Hier würde der unglückliche Fall eintreten, dass die Zielstruktur von endogenen und tgTZR gleichzeitig auf der selben APZ auftritt und somit die Stimulation über endogenen oder tgTZR nicht unterscheidbar wäre.

Der zweite etablierte CD8⁺ T-Zellklon IVSB exprimierte einen Tyrosinase-Peptid(YMD)-spezifischen und HLA-A2-restringierten endogenen TZR (Wolfel et al., 1993). Der IVSB-Klon ließ sich leicht transfizieren und exprimierte bereits nach kurzer Zeit den EBNA-1-spezifischen tgTZR auf der Zelloberfläche (Abb. 4.10 A). Aufgrund seiner Peptid-Spezifität ist er, anders als der JB4-T-Zellklon, auch für tgTZR geeignet, die potentiell HLA*0201-restringiert sind. Auf der anderen Seite sollte für die Analyse mit diesem Klon als Rezipienten der zu untersuchende TZR hoch-affin sein, da andernfalls die Stimulation nicht ausreicht, um innerhalb des Sensitivitätsspektrums des ELISA verwertbare Daten zu erhalten. Dies wird deutlich, wenn man die sezernierte Zytokinmenge nach Stimulation über den weitaus schwächeren endogenen TZR des IVSB-Klons mit den freigesetzten Zytokinmengen nach Stimulation über den höher affinen TZR-EBNA-1 vergleicht (Abb. 4.15 B). Eine unerwünschte Hintergrundaktivierung beider T-Zellklone konnte nicht beobachtet werden.

5.1.6 Charakterisierung des XAGE-1-spezifischen TZR M244

Unter Verwendung des Viruspeptid-spezifischen TZR-EBNA-1 erwiesen sich die etablierten T-Zellklone IVSB und JB4 als geeignete TZR-Rezipientenzellen, um eine funktionelle Charakterisierung des tgTZR zu ermöglichen. Allerdings stellte sich heraus, dass die TTA-spezifischen TZR nach Bindung des spezifischen Peptides eine zu geringe Aktivierung der T-Zellklone zur Folge hatten, wodurch zu geringe IFN- γ -Mengen sezerniert wurden. Als alternative TZR-Rezipientenzellen wurden PBL herangezogen, da diese generell größere Mengen an Zytokine sekretieren konnten. Weitere Vorteile der PBL waren die Expansion der Zellen innerhalb kürzester Zeit durch die Stimulation mit PHA oder Anti-CD3/-CD28-Antikörper und die erfolgreiche Expression von TZR-codierender ivt-mRNS.

Als nachteilig kann die mögliche Konkurrenz des tgTZR mit dem endogenen TZR um die Expression auf der Zelloberfläche angesehen werden. So kann es zu Fehlpaarungen zwischen endogenen und transgenen TZR-Ketten kommen, wodurch zum einen die Anzahl korrekt gepaarter tgTZR-Ketten auf der Zelloberfläche vermindert wird und zum anderen unvorhersehbare Spezifitäten durch die Neukombination der TZR-Ketten entstehen können (Shao et al., 2010).

Des Weiteren zeigten PBL unabhängig von einem tgTZR eine starke Hintergrundreaktivität gegen mLCL, die als APZ fungierten. Diese Reaktivität beruhte nicht auf einer Erkennung von EBV-Proteinen oder einer Alloreaktivität gegen fremde MHC-Moleküle, da PBL eines EBV-negativen bzw. autologen Spenders ebenfalls durch mLCL aktiviert wurden. Grundsätzlich boten sich mLCL/LCL als APZ an, da sie nahezu unendlich expandierbar sind und nicht, wie DZ, auf Zytokine für die Ausreifung angewiesen sind (Moosmann et al., 2002). Um jedoch die Hintergrundreaktivität zu eliminieren, wurde auf mDZ zurück gegriffen.

So wurde die TZR-Sequenz des Klons M244, der in der ersten Analyse spezifisch durch TTA-transfizierte mDZ aktiviert wurde, isoliert und mit Hilfe der TZR-Bibliothek rekonstruiert. Um die Antigenspezifität zu bestimmen, wurden PBL mit tgTZR-M244-ivt-mRNS transfiziert und mit autologen 3d-mDZ kokultiviert, die jeweils eines der fünf TTA nach Transfektion mit CrossTA_g-Antigen-ivt-mRNS exprimierten (Abb. 4.19 B). Es konnte nachgewiesen werden, dass TZR-M244 ausschließlich die CrossTA_g-XAGE-ivt-mRNS-transfizierten mDZ erkannte.

Somit stellte sich als nächstes die Frage, ob tatsächlich ein Epitop von XAGE-1 erkannt wurde. Denn generell bestand die Möglichkeit, dass ein neues Epitop, das an den Schnittstellen zwischen XAGE-1-Antigen und CrossTA_g-Sequenzen entstanden sein könnte, immunogen genug war, um T-Zellen de novo zu induzieren, wie es für CD4⁺ T-Zellen bereits gezeigt wurde (Ellinger, 2013). Grundsätzlich ist es schwer zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um eine Induktion von naiven T-Zellen gegen ein Neoepitop handeln würde, denn es bestünde auch die Möglichkeit einer zuvor bereits erwähnten Kreuzreaktivität der CD8⁺ T-Zellen (Fujinami et al., 2006; D'Orsogna et al., 2012). Um die XAGE-1-Spezifität zu überprüfen, wurden daher mDZ entweder mit CrossTA_g-

XAGE-1-ivt-mRNS oder mit XAGE-1-ivt-mRNS transfiziert und jeweils mit TZR-M244-exprimierenden PBL kokultiviert. Da beide mDZ-Populationen von den transfizierten PBL erkannt wurden, bewies dies die XAGE-1-Spezifität des tgTZR. Denn hätte der TZR-M244 ein CrossTag-bedingtes Neoepitop erkannt, wären die mDZ, die mit XAGE-1-ivt-mRNS transfiziert waren, nicht von den TZR-M244-PBL erkannt worden.

Interessanterweise führten die CrossTag-XAGE-1-transfizierten mDZ zu einer stärkeren Stimulation als die XAGE-1-transfizierten mDZ. Dies könnte damit erklärt werden, dass die CrossTag-Sequenzen zu einer effizienteren Beladung und Präsentation der Peptide auf MHC-Moleküle führen. Dieses Phänomen konnte ebenfalls mit CrossTag-Melan-A_(ELA)-transfizierten mDZ beobachtet werden, die zu einer weitaus stärkeren Stimulation eines Melan-A_(ELA)-spezifischen CD8⁺ T-Zellklons führten, als es die Melan-A_(ELA)-ivt-mRNS-transfizierten mDZ konnten (Abb. 4.20 B).

5.2 Eignung von TTA als Zielantigene für die Tumorthherapie

Wie eingangs bereits ausführlich beschrieben, werden nach heutigem Wissenstand diejenigen TTA als beste Kandidaten für eine zielgerichtete Tumorthherapie angesehen, die eine restringierte Expression in immunprivilegiertem Gewebe oder Tumorgewebe und eine starke Immunogenität aufweisen. Basierend darauf wurden sechs vielversprechende Kandidaten der bislang über 100 bekannten TTA in dieser Arbeit ausgewählt, um auf transkriptioneller Ebene die Expression in verschiedenen Zelltypen zu analysieren. Fünf der untersuchten TTA wurden für die Induktion einer spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort ausgewählt.

Obwohl mehrfach postuliert wurde, dass TTA auf bestimmte Gewebearten restringiert sind, wurden Berichte laut, die von der Expression bestimmter TTA in Normalgewebe sprechen. Beispielsweise wurde entdeckt, dass einige MAGE-Proteine in geringem Maße in Normalgewebe, wie in den Zellen von Larynx und Lippe, exprimiert werden (Jungbluth et al., 2000). Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit beobachtet, dass MAGE-A4 gehäuft in aktivierten Zellen vorkam, was mit der beschriebenen Rolle dieses Proteins in der Zellzykluskontrolle erklärbar ist (Cheng et al., 2011). Erst vor kurzem stellte sich überraschenderweise heraus, dass MAGE-A12 von Gehirnzellen exprimiert wird, mit teilweise fatalen Konsequenzen für die immuntherapeutisch behandelten Krebspatienten: PBL wurden mit einem TZR transduziert, der spezifisch MAGE-A3 erkannte, aber aufgrund der Homologie innerhalb der MAGE-A-Familie ebenfalls kreuzreaktiv zu MAGE-A12 war. Insgesamt wurden neun Krebspatienten mittels adoptiven T-Zelltransfer behandelt, wobei 1/9 Patienten eine komplette Remission erfuhr, 4/9 eine partielle Immunantwort zeigten und 4/9 nicht auf die Behandlung ansprachen. Zwei der an der Studie teilgenommenen Patienten überlebten die Behandlung jedoch nicht, da MAGE-A3-TZR-PBL durch das von den Neuronen exprimierte MAGE-A12 aktiviert wurden, was zu einer massiven Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung mit nekrotisierender

Leukenzephalopathie führte und schließlich den Tod der Patienten zur Folge hatte (Morgan et al., 2013). Zusammenfassend ist es fraglich, ob sich MAGE-A4 für einen T-Zell-basierten immuntherapeutischen Einsatz eignet, bedenkt man die sequentielle Ähnlichkeit der einzelnen MAGE-Familienmitglieder untereinander und die MAGE-Expression in manchen Normalgeweben sowie die erst kürzlich beschriebenen toxischen Nebenwirkungen in der erwähnten klinischen Studie.

Hingegen war NY-ESO-1 bereits Gegenstand einiger klinischer Studien, wobei bisher keine ernsthaften Nebenwirkungen beobachtet wurden. Außerdem wird das Antigen von einer Vielzahl von Tumoren exprimiert. Daher scheint es ein für den immuntherapeutischen Ansatz vielversprechendes Zielantigen zu sein. Beispielsweise erwies sich der klinische Einsatz von NY-ESO-1-spezifischen TZR, transduziert in T-Zellen, bislang als sicher, da keine schwerwiegenden toxischen Nebeneffekte beobachtet wurden. So zeigten 4/6 Synovialsarkompatienten und 5/11 Melanompatienten eine Verringerung des Tumordurchmessers und wiesen keine neuen Tumorfokalisationen auf (*objective clinical response*; Rosenberg et al., 2004). Allerdings befanden sich nur 2/11 Melanompatienten in kompletter Remission und 1/6 Synovialsarkompatienten erlebte eine partielle Remission, die 18 Monate anhielt (Robbins et al., 2011).

Ebenso resultierte die Vakzinierung von 46 Patienten mit NY-ESO-1-Protein in Kombination mit einem Adjuvans (ISCOMATRIX™) in einer zellulären und humoralen Immunantwort gegen NY-ESO-1. Dabei konnten sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen aus behandelten Patienten isoliert werden, die eine Vielzahl verschiedener NY-ESO-1-Epitope erkannten. In einer Folgestudie einige Jahre später, zeigten 14/26 Patienten eine reaktivierbare CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort gegen NY-ESO-1 (Davis et al., 2004; Nicholaou et al., 2011). Die subkutane Injektion von NY-ESO-1-Peptid erwies sich ebenfalls als gut verträglich und löste in 9/10 Patienten eine B-Zellantwort und in 10/10 Patienten eine T-Zellantwort aus (Kakimi et al., 2011). Daneben zeigte eine weitere Studie, die prognostische Relevanz von NY-ESO-1-spezifischen zirkulierenden T-Zellen hinsichtlich des Überlebens von Melanompatienten und damit die therapeutische Relevanz von NY-ESO-1 in der Immuntherapie (Weide et al., 2012).

GAGE-1 ist ein weiteres TTA, allerdings in der Tumorthherapie weniger verbreitet eingesetzt als die beiden zuvor erwähnten Antigene. Es wird von einer Vielzahl von Tumoren exprimiert. Daneben ergab die in dieser Arbeit durchgeführte Expressionsanalyse, dass GAGE-1 relativ häufig in T-Zellen und PBMZ vorkam. Aufgrund der insgesamt aber sehr geringen Transkriptmengen wurde GAGE-1 dennoch als Zielantigen für die De-novo-Induktion ausgewählt. Von den insgesamt 13 TTA-spezifisch getesteten TZR waren vier GAGE-1-spezifisch (31%), was auf eine starke Immunogenität des Antigens schließen lässt. Die starke Immunogenität und die weit verbreitete Expression von GAGE-1 in Tumoren sprechen für die Anwendung eines GAGE-1-spezifischen TZR in der Tumorthherapie. Andererseits wird dieses Antigen offenbar nicht homogen von allen Tumorzellen exprimiert, so dass in vielen Tumorarten Zellen vorkommen, die GAGE-1-negativ sind, wodurch eine Tumorflokt begünstigt würde. Da GAGE-1 jedoch häufig mit anderen TTA

koexprimiert wird, könnte es in Kombination mit einem weiteren Tumor-assoziierten Zielantigen für die Tumorthherapie eingesetzt werden, um somit die Tumorflicht zu verhindern (Gjerstorff et al., 2006).

SSX4 gehört zu der SSX-Multigenfamilie, die durch die Translokation von Chromosomen entsteht. In über 90% der Synovialkarzinom liegt eine chromosomale Translokation (t(X;18)(p11;q11)) vor, wodurch es z.B. zur Fusion von SSX4 auf dem X-Chromosom mit dem SYT-Gen auf Chromosom 18 kommt (Kawai et al., 1998; Torres et al., 2008; Cheng et al., 2011). Daher wäre ein TZR, der ein Epitop an der Schnittstelle der beiden Proteine erkennt vermutlich eine sichere Option für die Tumorthherapie, da diese Mutation auf Krebszellen bzw. entartete Zellen beschränkt ist.

XAGE-1 wurde ebenfalls in vielerlei Krebsarten nachgewiesen, darunter in Glioblastom (44%), Lungenkarzinom (35%) und Adenokarzinom (45%) (Nakagawa et al., 2005; Sato et al., 2007; Freitas et al., 2013). In vitro wurden durch XAGE-1b-Protein-beladene DZ zytotoxische T-Lymphozyten generiert, die Tumorzellen von NSCLC (*non-small-cell lung carcinoma*)-Patienten, nicht aber normale Lungenepithelzellen erkannten (Zhou, Q. et al., 2008). Die Immunogenität von XAGE-1b konnte in Lungenkarzinom (NSCLC)-Patienten anhand der B- und T-Zellantwort gezeigt werden. In 20/200 NSCLC-Patienten konnte eine humorale Immunantwort induziert werden. In 14/16 der Antikörper-positiven Patienten konnte eine CD4⁺ T-Zellantwort und in 6/9 eine CD8⁺ T-Zellantwort detektiert werden. Damit stellt XAGE-1b bis dato das vielversprechendste immuntherapeutische Zielantigen für Lungenadenokarzinome dar (Ohue et al., 2012). Die starke Immunogenität führte vermutlich auch zur Isolierung des XAGE-1-spezifischen TZR des Klon M244. Im Vergleich zu den übrigen spezifischen T-Zellen sezernierte der Klon M244 mehr IFN- γ , was möglicherweise auf einen höher affinen TZR hinweist. Demnach ermöglicht der XAGE-1-spezifische Rezeptor u.U. einen für z.B. NSCLC-Patienten wertvollen Therapieansatz im Rahmen des adoptiven T-Zelltransfer.

cTAGE-1 kam aufgrund seines ubiquitären Vorkommens in allen hier untersuchten Zelltypen für die De-novo-Induktion nicht in die nähere Auswahl, denn der therapeutische Wert dieses Antigens ist vermutlich eher gering einzuschätzen, da PBL, die mit einem cTAGE-1-spezifischen TZR transduziert würden, sich gegenseitig umbringen könnten, wenn diese das Antigen endogen exprimierten. Die einzige Einsatzmöglichkeit wäre in chimären Patienten, die eine allogene Stammzelltransplantation durchlaufen haben. Denn somit würden die transduzierten T-Zellen nicht das restringierte MHC-I-Allel des tgTZR auf der Oberfläche tragen, sondern dies würde nur von z.B. Tumorzellen exprimiert werden (Schendel, 2012). Dies setzt allerdings voraus, dass cTAGE-1 nicht in anderen Normalgeweben exprimiert wird.

Für prominente TTA wie NY-ESO-1 wurde die Sicherheit und Immunogenität in einigen klinischen Studien bereits gezeigt. Für die anderen Antigene sind weitere Untersuchungen notwendig. Grundsätzlich bieten TTA im Vergleich zu manch anderen Tumor-assoziierten, nicht-viralen Antigenen eine relativ gute Perspektive hinsichtlich Sicherheit und Immunogenität, wobei man nicht umhin

kommen wird, jedes Antigen einzeln zu evaluieren. Auf der anderen Seite besteht grundsätzlich die Gefahr, dass Tumoren TTA herunterregulieren können, falls diese Antigene nicht für das Tumorstadium essentiell sind und somit einer Immunantwort entgehen können. Dies hängt jedoch von der Funktion der einzelnen TTA ab, die bislang bei vielen noch weitgehend unbekannt ist. Ohne die Funktion jedoch zu kennen, ist es schwer vorherzusagen, ob eine Tumorstadium durch den therapeutischen Einsatz eines der TTA als Zielantigen möglich ist.

5.3 Induktionskapazität der CrossTA_g-Antigen-ivt-mRNS-transfizierten mDZ in vivo

Nachdem in vitro erfolgreich TTA-spezifische CD8⁺ T-Zellen generiert werden konnten, galt es zu klären, ob auch in einem In-vivo-Mausmodell Melan-A-spezifische CD8⁺ T-Zellen induziert werden können. Dabei sollte die Induktionseffizienz von dendritischen Zellen, die mit normaler Antigen-ivt-mRNS oder mit der CrossTA_g-gekoppelten Antigen-ivt-mRNS transfiziert worden waren, verglichen werden. Entscheidend bei diesem Ansatz war vor allem, dass es zu keinem inhibitorischen Effekt für die Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch die parallel induzierten CD4⁺ T-Zellen kam, wie es beispielsweise für regulatorische CD4⁺ T-Zellen beschrieben ist.

5.3.1 NSG-Mäuse als Grundlage eines humanisierten In-vivo-Modells

Um die oben genannte Fragestellung zu beleuchten, wurde das in unserer Arbeitsgruppe von Spranger et al. etablierte vierwöchige Protokoll zur Rekonstitution und Vakzinierung von NSG-Mäusen adaptiert und modifiziert (Spranger et al., 2012).

Folgende in der Literatur beschriebenen Eigenschaften machten den verwendeten Mausstamm für die Zwecke des hier durchgeführten Versuchsansatzes zu einem geeigneten Modellsystem: NSG (NOD/SCID/IL-2R^γnull)- Mäuse sind homozygot für die SCID (severe combined immunodeficiency)-Mutation und homozygot für die Mutation in der IL-2-Rezeptor- γ -Kette. Sie wurden durch Rückkreuzungen von C57BL/6J- γ c^{null}- mit NOD/Shi-scid Mäusen, die sich durch das Fehlen von reifen Lymphozyten und Komplementfaktoren sowie funktionalen Makrophagen auszeichneten, etabliert. NSG-Mäuse sind defizient für T-, B- und NK-Zellen. Durch die Immundefizienz wird eine Nische für die Rekonstitution mit humanen Immunzellen gebildet. Die Abwesenheit von NK-Zellen verbesserte die Effizienz der Rekonstitution humaner Zellen in NSG-Mäusen gegenüber NOD/Shi-scid-Mäusen. Hinzu kommt die verminderte IFN- γ -Sekretion durch murine DZ sowie die Inhibition des Immunsystems in seiner Funktion durch fehlendes IFN- γ , das die Rekonstitutionseffizienz mit häma-

topoietischen Zellen steigerte (Ueda et al., 2000; Yoshino et al., 2000; Ito et al., 2002).

Die beschriebene durchschnittliche Überlebensrate unbehandelter NSG-Mäuse unter sterilen Bedingungen ist gegenüber den NOD/SCID-Mäusen mit etwa 89 Wochen statt 37 Wochen ebenfalls deutlich verlängert. Die Rekonstitution von bestrahlten Mäusen mit $0,7 \times 10^5$ CD34⁺ angereicherten Zellen aus PBMZ gesunder Spender führte zur Generierung humaner T-Zellen in Mausmilzen nach zehn Wochen (Shultz et al., 2005).

Im Gegensatz dazu wurden die NSG-Mäuse in dieser Arbeit mit gesamten PBMZ (nicht CD34⁺ angereichert), die aus Vollblut eines gesunden Spenders aufgereinigt worden waren, durch intravenöse Applikation ohne vorangegangener Bestrahlung der Mäuse rekonstituiert. Durch den Verzicht auf die CD34⁺ Zellanreicherung werden auch reife CD3⁺ T-Zellen, die bei jedem gesunden Menschen im Blut zirkulieren, injiziert. Die xenoreaktiven T-Zellen unter ihnen verursachen nach einer gewissen Zeitspanne *Graft-versus-Host-Reaktionen* (GvHD, *graft-versus-host disease*), die für die Mäuse tödlich enden (Shultz et al., 2005). Dies erklärt die nach vier Wochen eingetretene Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Versuchstiere (z.B. struppiges Fell, verändertes/ge ducktes Gangverhalten). Außerdem ist vermutlich der Anteil an potentiell xenoreaktiven T-Zellen stark spenderabhängig, da sich nicht jeder Spender für die Versuchsdurchführung eignete (persönliche Beobachtung).

Zur Untersuchung der Induktionseffizienz wurde als Zielantigen Melan-A ausgewählt. Melan-A eignet sich als Modellantigen zur Überprüfung der Induktionseffizienz insofern, als dass viele gesunde HLA-A*0201-positive Individuen eine relativ hohe Frequenz (0,1%) an naiven Vorläufer-T-Zellen gegen Melan-A im Blut aufweisen (Pittet et al., 1999).

5.3.2 Versuchsablauf und Durchführung

Dem etablierten Protokoll folgend, wurden 16 Mäuse mit jeweils 10×10^6 humanen PBMZ innerhalb von zwei Wochen rekonstituiert. Daraufhin erfolgten im wöchentlichen Abstand zwei Vakzinierungen mit jeweils 1×10^6 (CrossTag-)Melan-A-ivt-mRNS-transfizierten mDZ. Wie bereits erwähnt, wurden an dem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll einige Veränderungen vorgenommen. So wurde zusätzlich zu dem von Spranger et al. hinsichtlich der Induktionseffizienz in Mäusen am erfolgreichsten getesteten mDZ-Maturierungscocktail (C5 + R848) Poly:IC als TLR3-Ligand hinzugefügt, da dies dem Cocktail entsprach, der für die De-novo-Induktion der PBL in vitro verwendet worden war (Spranger et al., 2012).

Die Integrität der verwendeten ivt-mRNS wurde vor Versuchbeginn über die intrazelluläre Färbung des Melan-A-Proteins in den transfizierten mDZ sowie deren Stimulationfähigkeit des Melan-A-spezifischen Testklons 11/33 bestätigt (Abb. 4.22 A und B). Die Ausgangs-Zellpopulation, die für die Rekonstitution eingesetzt wurde, zeigte für einen Spender über 50 Jahren eine erwartete

prozentuale Verteilung von CD3⁺ (Normwert: 50,7 – 82,2%; Spender: 74,4%), CD4⁺ (Normwert: 31,2 – 63,4%; Spender: 48,0%) und CD8⁺ (Normwert: 9,2 – 33,6%; Spender: 26,4%) T-Zellen, sowie für B- (Normwert: 4,4 – 21,5%; Spender: 5,4%) und NK-Zellen (Normwert: 4,9 – 32,9%; Spender: 5,4%). Der Anteil an CD8⁺ CD25⁺ T-Zellen bewegte sich ebenfalls innerhalb der von Bisset et al. untersuchten Normwerte (Normwert: 0,0 – 1,0%; Spender: 0,2%) (Abb. 4.23) (Bisset et al., 2004).

Die reisolierten PBMZ wurden hinsichtlich verschiedener Subpopulationen am siebten Tag nach der letzten In-vivo-Restimulation (= 2. Vakzinierung mit Melan-A-exprimierenden mDZ) untersucht (Abb. 4.24 A-E). Dieser Zeitpunkt entsprach laut Caruso et al. etwa dem Expressionsmaximum von CD25 und CD69 nach Antigenstimulation von CD3⁺ T-Lymphozyten (Caruso et al., 1997). Verglichen mit der Ausgangspopulation zeigte sich keine prozentuale Veränderung der CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen. Allerdings waren doppelt so viele CD8⁺ T-Zellen positiv für den Aktivierungsmarker CD69 (von 3% auf 7,5 – 8%) und 12-mal so viele für CD25 (von 0,2% auf 3-4%) als vor der Rekonstitution. Dies deutete daraufhin, dass eine Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen zwischen dem Zeitraum der Rekonstitution bis zur Reisolierung aus den Mausmilzen stattgefunden hatte.

Der Anteil an CD137-positiven CD8⁺ T-Zellen nach Reisolierung der PBMZ lag zwischen 6-7%, was vermuten lässt, dass dieser Anteil an CD8⁺ T-Zellen innerhalb der letzten 72 Stunden stimuliert wurde, da anschließend die Expression des Markers nach Angaben von Watanabe et al. wieder verschwindet (Watanabe et al., 2008).

Im Falle der CD4⁺ T-Zellen verzehnfachte sich die Population der CD69⁺ T-Zellen (von 0,7% auf 7-9%) innerhalb der Induktionsphase. Der prozentuale Anteil an CD25-positiven CD4⁺ T-Zellen bewegte sich zwischen 6-8%. Des Weiteren wurde beschrieben, dass regulatorische CD4⁺ T-Zellen ebenfalls CD137 exprimieren (Goldstein et al., 2012). Demnach war der Anteil an CD4⁺, CD137-doppelt positiven regulatorischen T-Zellen in den reisolierten PBMZ sehr gering (2-3,5%).

Der Vollständigkeit halber und um die Dynamik der einzelnen Zellpopulation über den Untersuchungszeitraum hinweg zu überwachen, wurden ebenfalls B- und NKT-Zellen untersucht. Der Anteil an B-Zellen blieb während des ganzen Versuchablaufs relativ konstant, wobei in einigen wenigen Mäusen eine starke Proliferation dieser Zellen stattgefunden hatte (Ausgangspopulation: 5,5%; nach Reisolierung: eine Maus in der Kontrollgruppe ~21%; eine Maus in der CrossTag-Melan-A-Gruppe ~20%). Der prozentuale Anteil an NKT-Zellen verringerte sich während der Zeit in vivo von ursprünglich 16,3% der CD8⁺ NKT-Zellen auf 2-4% und von 5% der CD4⁺ NKT-Zellen auf unter 1%.

Nach der Isolierung der Milzzellen wurden diese statt unspezifisch mit Anti-CD3-Antikörpern, spezifisch mit den jeweiligen Gruppen zugehörigen mDZ in vitro restimuliert. Dadurch sollte vermieden werden, dass die im Vergleich zur Gesamtheit der aktivierten T-Zellen wenigen Melan-A-spezifischen T-Zellen überwachsen wurden und deren Frequenz stark verringert wurde. Nach zehn Tagen der Kultivierung erfolgte eine weitere Analyse der Subpopulationen und wird im Folgenden mit

dem Zeitpunkt der Reisolation verglichen (Abb. 4.26 A-D).

Der Prozentsatz an CD8⁺ T-Zellen blieb während dieser Zeit unverändert, wohingegen die CD4⁺ T-Zellen in allen Gruppen, außer der Kontrollgruppe, einen leichten Anstieg erfuhr. Dies konnte aber kein Effekt des CrossTAG-Konstruktes sein, da auch in der Gruppe, die ohne CrossTAG-ivt-mRNS-exprimierenden DZ vakziniert wurde, ein äquivalenter Anstieg zu beobachten war. Weiterhin wurde beschrieben, dass sowohl CD4⁺ T-Zellen als auch NKT-Zellen IL-21 produzieren, das in Kombination mit IL-2 das Zellwachstum der NKT-Zellen verstärkt. Daher könnte das von den NKT-Zellen sekretierte IL-21 im Zusammenhang mit IL-2, das der Kultur regelmäßig zugesetzt wurde, die Proliferation der NKT-Zellen erklären, denn der Anteil an CD8⁺ NKT-Zellen nahm in allen Gruppen zu (Zeng, R. et al., 2005; Coquet et al., 2007).

Den B-Zellen schien ein Überlebenssignal in der Kultivierung gefehlt zu haben, da deren Zellzahl innerhalb der kurzen in vitro Zeitspanne stark zurückging. Es wurde beschrieben, dass neben IL-2 auch IL-15 für die B-Zellproliferation eine wichtige Rolle spielt (Armitage et al., 1995). Da IL-15 am stärksten von Zellen, wie adhärenenten Monozyten, Epithel- und Fibroblastenzellen exprimiert wird, die sich jedoch nicht in der Kultur befanden, könnte dies ein fehlender Faktor gewesen sein (Grabstein et al., 1994).

5.3.3 Verbesserte DZ-Vakzine durch Verwendung der CrossTAG-ivt-mRNS-Sequenzen

Die Induktionseffizienz der unterschiedlichen DZ-Vakzinen wurde anhand der Frequenzanalyse Melan-A-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels Tetramer sowie über die funktionelle Analyse im ELISpot miteinander verglichen.

Bereits nach Isolierung der Milzzellen konnten signifikant mehr Melan-A-spezifische CD8⁺ T-Zellen in den Gruppen, die mit CrossTAG-ivt-mRNS-transfizierten mDZ vakziniert wurden, beobachtet werden (Abb. 4.25 B und C). Ohne die Stimulation der CD4⁺ T-Zellhilfe konnte zwar ebenfalls eine kleine spezifische CD8⁺ T-Zellpopulation nachgewiesen werden, diese bewegte sich allerdings nicht in einem zur Kontrollgruppe signifikant unterschiedlichen Bereich.

Dieser Effekt verstärkte sich dramatisch nach der In-vitro-Kultivierung mit den entsprechenden mDZ (Abb. 4.27 A und B). Eine deutlich abgesetzte Melan-A-spezifische CD8⁺ T-Zellpopulation konnte ausschließlich in den Gruppen mit CD4⁺ T-Zellhilfe detektiert werden. In Melanompatienten konnten Van Nuffel und Kollegen die erfolgreiche Induktion einer spezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellantwort gegen Proteine der MAGE-Familie, die an murines LAMP-1 und humanes DC-LAMP gekoppelt waren, zeigen (Van Nuffel et al., 2012a). Somit wurde die Funktionalität der Signalsequenzen ebenfalls im humanen System gezeigt. Der Unterschied zu den von Van Nuffel und Kollegen eingesetzten Konstrukten, ist die in dieser Arbeit verwendete humane LAMP-1 Sequenz statt

des murinen Homologs. Dies könnte eine Verbesserung darstellen, da Van Nuffel et al. durch die Verwendung des murinen LAMP-1 ebenfalls T-Zellen isolierten, die Neo-Epitope im Zusammenhang mit der murinen Sequenz erkannten. Die Immunogenität von LAMP-1 könnte durch den Einsatz der humanen Sequenz deutlich verringert worden sein, denn es handelte sich bei der murinen Sequenz schließlich um ein für die T-Zellen fremdes, nicht-humanes Protein.

Im ELISpot wurde die Funktionalität der Melan-A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen untersucht. Dabei stellte sich ein bezüglich der Tetramerfärbung zu erwartendes Resultat ein. Denn die PBMZ, die mit CrossTag-Melan-A-ivt-mRNS-transfizierten mDZ induziert worden waren, wiesen eine deutlich höhere, gegen die Melanomzelllinie Mel624.38 gerichtete, spezifische Aktivität auf (Abb. 4.28). Im Gegensatz dazu konnte keine Reaktivität der Melan-A-spezifischen T-Zellen in der Kontrollgruppe oder in der Gruppe ohne CrossTag-Sequenzen detektiert werden. Die beobachtete Reaktivität der Zellen in den CrossTag-induzierten Gruppen beruhte vermutlich tatsächlich auf einer CD8⁺ T-Zellantwort, denn die Melanomzelllinie exprimiert kein MHC-II auf der Oberfläche. Grundsätzlich war es möglich, dass das durch die aktivierten CD8⁺ T-Zellen sezernierte IFN- γ die Expression von MHC-II auf den Zielzellen induzierte (Ting und Trowsdale, 2002). Daher wurde die Melanomzelllinie mit unterschiedlichen Dosen an IFN- γ (4000/2000/500/100 U/ml) behandelt und anschließend erneut hinsichtlich der MHC-II-Expression untersucht. Auch nach Zusatz von IFN- γ wurde MHC-II nicht auf der Zelloberfläche detektiert (Daten nicht gezeigt). Außerdem bestand grundsätzlich die Möglichkeit, dass einige CD4⁺ T-Zellen im Zusammenhang mit MHC-I Melan-A erkannten (Boyle et al., 2004). Um die beobachtete Reaktivität eindeutig auf CD8⁺ T-Zellen zurückführen zu können, müsste der ELISpot-Ansatz mit separierten CD8⁺ T-Zellen wiederholt werden. Allerdings spricht die Übereinstimmung der Tetramerdaten mit den ELISpot-Ergebnissen dafür, dass die beobachtete Reaktivität im ELISpot auf CD8⁺ T-Zellen beruhte.

Die gezeigten In-vivo-Daten demonstrieren die Überlegenheit der mDZ, die mit CrossTag-gekoppelter Melan-A-ivt-mRNS transfiziert wurden gegenüber den mDZ mit Melan-A-ivt-mRNS ohne Signalsequenzen. Ergänzend zu den In-vitro-Ergebnissen konnte somit auch in vivo die Induktion funktionaler und Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Einsatz der CrossTag-Sequenzen gezeigt werden.

Nun könnte man bei den In-vivo-Daten argumentieren, dass mehr mDZ der zweiten Vakzinierung nach Transfektion mit dem CrossTag-Melan-A-Konstrukt das Melan-A-Protein exprimierten (50%), als es bei mDZ der Fall war, die nur mit Melan-A-ivt-mRNS transfiziert wurden (35%) (Abb. 4.23 C), und damit der große Unterschied in der Induktionseffizienz der einzelnen Gruppen zu erklären ist. Andererseits fanden Celli et al. heraus, dass bei einer Vorläuferfrequenz von 10^{-6} spezifischen Zellen (das bedeutet 1 spezifische Zelle pro 1×10^6 Zellen) bereits 85 Antigen-präsentierende DZ, unabhängig von der Größe der Lymphknoten, ausreichen, um eine spezifische T-Zellantwort einzuleiten (Celli et al., 2012). Übertragen auf das in dieser Arbeit durchgeführte Experiment bedeutet dies, dass etwa 1000 Vorläuferzellen pro 1×10^6 PBMZ vorlagen (Pittet et al., 1999), für

deren Induktion etwa $0,85 \times 10^5$ Melan-A-exprimierende mDZ benötigt wurden. Da die Vakzinierung mit 1×10^6 transfizierter mDZ durchgeführt wurde, erhielten die Mäuse etwa $3,5 \times 10^5$ Melan-A-exprimierende DZ (die vierfache Menge). Die Zahl der transfizierten mDZ sollte daher für eine umfassende Induktion der T-Zellen ausreichend gewesen sein. Jedenfalls kann damit nicht der große Unterschied zwischen den Gruppen in der Tetramerfärbung bereits nach Reisolierung der PBMZ erklärt werden. Zudem erhielt die gemischte Gruppe zwar mehr Melan-A-exprimierende mDZ ($4,25 \times 10^5$ DZ) als die Gruppe ohne CrossTA_g, aber weniger Melan-A-exprimierende mDZ als die reine CrossTA_g-Gruppe ($5,0 \times 10^5$ DZ). Und dennoch zeigte die gemischte Gruppe die meisten Melan-A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sowohl am Tag der Milzzellisolierung als auch nach der Kultivierung.

5.4 Die Rolle der CD4⁺ T-Zellhilfe für die Induktion und Expansion Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Das In-vivo-Experiment zeigte deutlich, dass für eine effiziente Induktion Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen die CrossTA_g-Sequenzen (LAMP-1 am N-terminalen Ende und DC-LAMP-1 am C-terminalen Ende des Antigens) entscheidend waren. Diese führen dazu, dass das Antigen nicht nur auf MHC-I, sondern auch auf MHC-II präsentiert wird und damit auch CD4⁺ T-Zellen induziert werden können (Ellinger, 2013). Zwar existieren auch Berichte über die Kreuzpräsentation von endogenen Antigenen auf MHC-II, jedoch führten die CrossTA_g-Sequenzen zu einer weitaus effizienteren Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen (Watts, 2004; Ellinger, 2013).

Ein weiterer Vorteil ist die beschriebene Präsentation von alternativen Epitopen, die erst durch die Fusion des Antigens an LAMP-1 und DC-LAMP-1 möglich wurde. Dabei blieb die Präsentation der immunodominanten Epitope des nativen verwendeten Antigens erhalten (Arruda et al., 2006). Somit eröffnen sich zusätzliche Epitope, die zu neuen Spezifitäten der T-Zellen führen können. Zugegebenerweise ist bislang ungeklärt, inwieweit die Erkennung dieser alternativen Epitope eine Rolle bei der Behandlung von Tumoren in Patienten spielen. Allerdings wird dadurch das Spektrum der TZR, die immunogene Antigen-assoziierte Epitope erkennen, erweitert und die Erkennung des Tumors möglicherweise verbessert, zumal in Tumoren zuweilen die MHC-I Präsentation herunterreguliert und dadurch das präsentierte Peptidrepertoire eingeschränkt wird (Alpan et al., 1996; Seliger, 2008). In dieser Arbeit wurde jedoch nicht untersucht, ob CD8⁺ T-Zellen außer dem „ELA“-Peptid auf HLA-A*0201 auch noch andere Melan-A-Epitope auf z.B. anderen MHC-I-Allelen erkennen. Möglicherweise eröffnen sich dabei noch bisher unbekannte Epitope. Des Weiteren wurde nicht geklärt, wie hoch der Prozentsatz an Melan-A-spezifischen CD4⁺ T-Zellen war, bzw. welche Epitope erkannt wurden.

Ein weiterer noch zu untersuchender Aspekt ist der direkte Nachweis dafür, dass Melan-A-spezifische CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe der CrossTag-gekoppelten Melan-A-ivt-mRNS induziert wurden, und dass die CD4⁺ T-Zellhilfe für die CD8⁺ T-Zellen ursächlich für den beobachteten positiven Effekt auf die Proliferation Melan-A-spezifischer CD8⁺ T-Zellen war. Um dies zu untersuchen, könnten in einem weiteren In-vivo-Experiment CD4⁺ T-Zellen, vor der ersten Vakzinierung mit CrossTag-Melan-A-ivt-mRNS-transfizierten mDZ, depletiert werden. Würde dann eine verminderte Induktionseffizienz beobachtet werden, könnte dies auf eine fehlende CD4⁺ T-Zellhilfe zurückzuführen sein.

Immer häufiger wird die Wichtigkeit der CD4⁺ T-Zellhilfe für eine erfolgreiche CD8⁺ T-Zellantwort und Gedächtnisentwicklung beschrieben. Vor allem für die Induktion eines CD8⁺ T-Zell-Gedächtnisses gegen Antigene, die kein „danger signal“ liefern, wie es einige pathogene Antigene (PAMPs: *Pathogen-associated molecular pattern*) tun, ist die CD4⁺ T-Zellhilfe essentiell (Wiesel und Oxenius, 2012). Darunter dürften auch Tumor-assoziierte Antigene wie Melan-A zählen, da diese, wie schon erwähnt, häufig Selbst-Antigene darstellen.

Das ursprüngliche Modell der CD4⁺ T-Zellhilfe beschreibt die indirekte über APZ verlaufende Hilfe für die CD8⁺ T-Zellen („DZ Lizenzierung“) durch gleichzeitige Bindung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an die APZ. Dabei bewirkt die Interaktion der CD4⁺ T-Zelle mit der DZ über Peptid:MHC-II die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD80 und CD86, sowie die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-12 durch die DZ. Durch die Bindung an diese „lizensierten“ DZ erfahren CD8⁺ T-Zellen neben dem primären Antigen-vermittelten Aktivierungssignal auch adäquate sekundäre Aktivierungssignale (Ahmed et al., 2012).

Die Frage, die dieses Szenario aufwirft, beschäftigt sich damit, wie wahrscheinlich es wohl ist, dass für ein bestimmtes Antigen spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die in einer niedrigen Frequenz vorkommen, zur selben Zeit an die selbe DZ binden. Aus dieser Überlegung heraus wurde das bisherige Modell erweitert, hin zum „dynamischen Modell der Drei-Zell (DZ, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen)-Interaktion“ (Ahmed et al., 2012) (Abb. 5). Ausgehend von der anfänglichen Interaktion von CD4⁺ T-Zellen mit den DZ gibt es drei verschiedene Möglichkeiten, wie CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden können: über die Interaktion „lizensierter“ DZ mit CD8⁺ T-Zellen, über die direkte Interaktion von aktivierten CD4⁺ T-Zellen mit den CD8⁺ T-Zellen oder über die indirekte Interaktion der beiden T-Zelltypen, während sie an die DZ binden. Letzteres wurde bereits 1997 von Bennett et al. in einem OVA-Mausmodell gezeigt (Bennett et al., 1997; Ahmed et al., 2012). Bedenkt man die Abhängigkeit der drei erwähnten CD8⁺ Aktivierungswege von der CD4⁺ T-Zellhilfe, ist die größere Induktionskapazität der CrossTag-Melan-A-ivt-mRNS-transfizierten mDZ im Vergleich zu den Melan-A-ivt-mRNS-transfizierten mDZ nicht verwunderlich, da durch Erstere gezielt auch CD4⁺ T-Zellen aktiviert werden konnten.

Die direkte Interaktion zwischen CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen wurde von verschiedenen Forschergruppen beschrieben. Während CD4⁺ T-Zellen APZ unabhängig vom CD40-Signalweg akti-

vieren können, ist es für CD40-exprimierende CD8⁺ T-Zellen von größter Wichtigkeit, CD40L auf CD4⁺ T-Zellen für die Ausbildung des immunologischen CD8⁺ T-Zellgedächtnisses, zu binden (Bourgeois et al., 2002). Davon unabhängig ist die primäre Induktion von CD8⁺ T-Zellen bei akuter Infektion (Xydia et al., 2011; Ahmed et al., 2012). Auf der anderen Seite wurde berichtet, dass CD8⁺ T-Zellen ebenfalls CD40L und CD4⁺ T-Zellen CD40 exprimieren können und dadurch eine bidirektionale Stimulation zwischen den beiden T-Zellsubpopulationen entsteht (Xydia et al., 2011). Damit übereinstimmend wurde eine kleinere Fraktion an CD40L⁺ CD8⁺ T-Zellen ebenfalls in dieser Arbeit nach spezifischer Stimulation der PBL detektiert (6,3%) (Abb. 4.7).

Neben der CD40-CD40L Interaktion können offensichtlich weitere Komponenten eine wichtige Rolle spielen. Wie bereits zuvor erwähnt, kann während der Interaktion von APZ und T-Zellen ein interzellulärer Austausch von Membranmolekülen (Trogozytose) stattfinden. So wurde gezeigt, dass CD4⁺ T-Zellen Peptid-MHC-I und kostimulatorische Moleküle von APZ übernehmen können und dadurch über MHC-I in direkten Kontakt mit CD8⁺ T-Zellen treten können (Ahmed et al., 2012). Diese Interaktionsmöglichkeit der CD4⁺ T-Zellen mit den CD8⁺ T-Zellen könnte leicht durch die durchflusszytometrische Analyse der MHC-I-Oberflächenfärbung auf CD4⁺ T-Zellen überprüft werden. Interessant wäre es zu untersuchen, ob solch eine Übertragung von MHC-I-Molekülen auf CD4⁺ T-Zellen durch die Verwendung des CrossTag-Konstruktes induziert wurde.

Des Weiteren wurde vor kurzem eine für die sekundäre Expansion von CD8⁺ T-Zellen wichtige Interaktion zwischen CD27 auf den T-Zellen und CD70 auf APZ berichtet. CD27 wird u.a. auf naiven zytotoxischen T-Lymphozyten und auf CD4⁺ T-Zellen exprimiert. DZ regulieren CD70 hoch, nachdem sie einen Stimulus über CD40 erhalten haben, d.h. von CD4⁺ T-Zellen lizenziert wurden. Die Interaktion von DZ mit CD8⁺ T-Zellen ermöglicht die Programmierung von CD8⁺ T-Zellen, die eine zweite Expansionsrunde durchlaufen können, ohne nach Restimulation apoptotisch zu werden (Feau et al., 2012).

Eine weitere von CD4⁺ T-Zellen kommende Hilfestellung für CD8⁺ T-Zellen, so dachte man, ist die IL-2 Sekretion, wodurch Differenzierung und Wachstum der CD8⁺ T-Zellen gefördert wird. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass CD8⁺ T-Zellen selbst das für ihre sekundäre Proliferation nötige IL-2 sekretieren (Feau et al., 2011).

Die aufgeführten Interaktionsmöglichkeiten und Hilfestellungen zwischen den drei Zellpopulationen – DZ, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen – lassen die Komplexität der Ausbildung einer erfolgreichen und lang anhaltenden CD8⁺ T-Zellantwort erahnen (Abb. 5). Sicherlich stellen die bisher bekannten Mechanismen und Interaktionspartner noch nicht das allumfassende Spektrum dar, denn viele verschiedene Faktoren, sei es beispielsweise die Natur des stimulierenden Antigens oder die Verabreichung und Kombination verschiedener Antigene, beeinflussen und modellieren die Immunantwort.

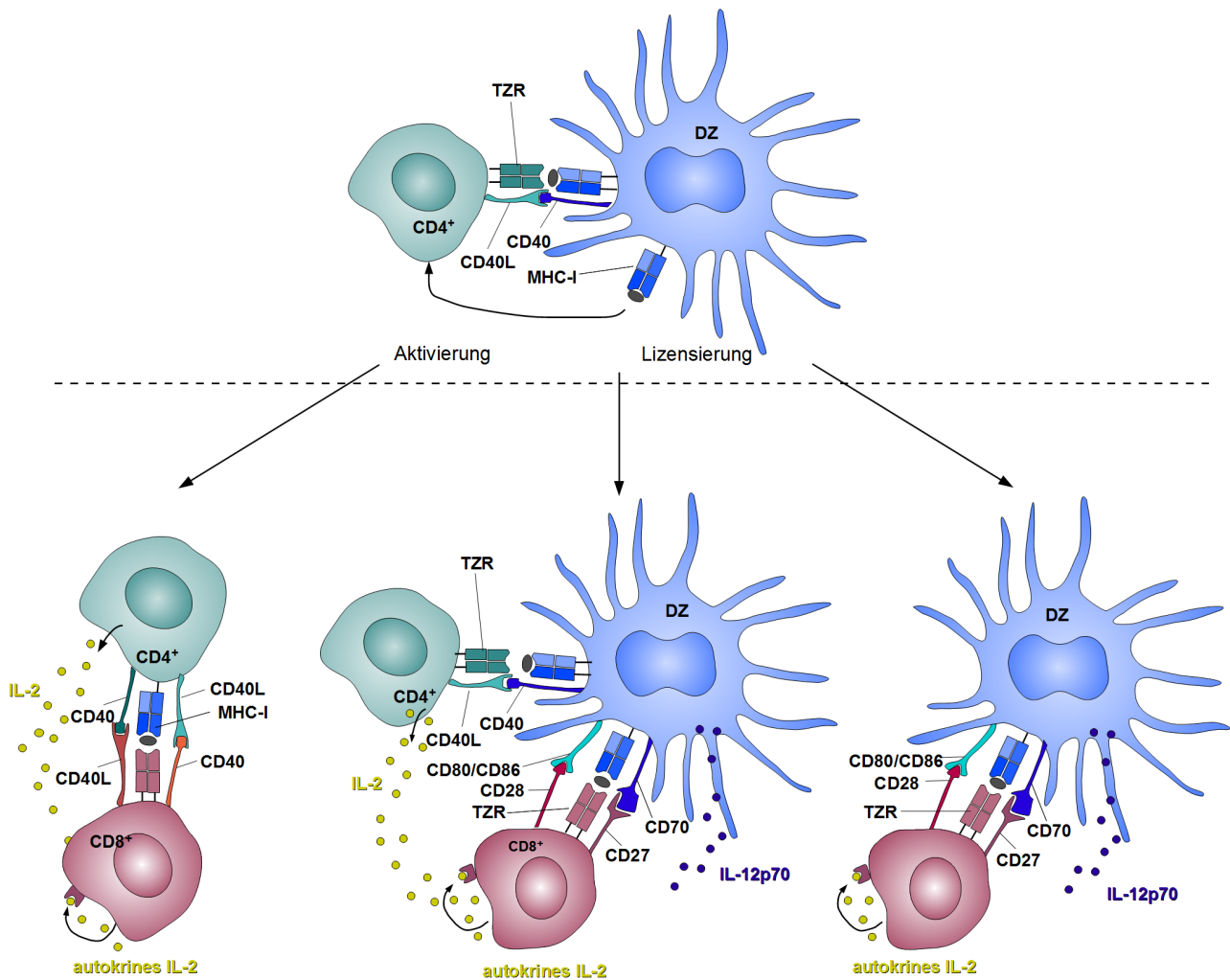


Abb. 5: Rolle der CD4⁺ T-Zellhilfe bei der Aktivierung von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Abb. nach Ahmed et al., 2012).

DZ erfahren durch die Interaktion mit CD4⁺ T-Zellen die sog. Lizensierung, wodurch sie die Fähigkeit erlangen, kostimulatorische Moleküle (z.B. CD80 und CD86) zu exprimieren und Zytokine (z.B. IL-12p70) zu sekretieren. CD4⁺ T-Zellen werden währenddessen aktiviert und regulieren CD40L hoch. Nach dem „dynamischen Modell der Drei-Zell (DZ, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen)-Interaktion“ werden CD8⁺ T-Zellen entweder durch direkte Interaktion mit CD4⁺ T-Zellen (CD40-CD40L und TZR-MHC-I), gleichzeitige Bindung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an DZ oder durch alleinige Interaktion mit DZ (z.B. CD28-CD80/86 oder CD27-CD70), aktiviert.

5.5. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter Einsatz verschiedener TTA-ivt-mRNS spezifische CD8⁺ T-Zellen gegen unterschiedliche Antigene induziert und isoliert werden konnten. Grundsätzlich muss sich die etablierte Methodik nicht auf TTA beschränken, sondern kann auf beliebige Zielantigene ausgeweitet werden. Bisher wurde von den hier generierten TZR nur der XAGE-1-spezifische TZR M244 transgen untersucht und die Antgenspezifität bestätigt. MHC-Restriktion, Affinität und Epitopidentifizierung sind weitere wichtige Aufgaben, die es herauszufinden gilt. Für letzteres kann die, von Milosevic et al. beschriebene DEPI-Methode (*direct epitope*

identification, DEPI) zu Hilfe genommen werden (Milosevic et al., 2006). Dabei handelt es sich um eine bakterielle Expressionsbibliothek, die alle relevanten Antigene in überlappenden Teilstücken repräsentiert. Dieses System wurde bereits im Rahmen dieser Arbeit als Vorbereitung für den Einsatz zur Identifizierung von CD8⁺ T-Zellepitopen dahingehend modifiziert.

Außerdem stehen weitere bereits sequenzierte und klonierte TZR bereit, um transgen in geeignete Rezipientenzellen transferiert und nachfolgend funktionell charakterisiert zu werden. Durch die Analyse weiterer TZR könnten u.U. Rückschlüsse auf die Immunogenität der eingesetzten TTA gezogen werden, sollten gehäuft spezifische TZR gegen ein oder mehrere TTA isoliert worden sein. Wie bereits ausführlich diskutiert, stellen TTA bis dato die vielversprechendsten Zielantigene für den Einsatz in der Tumorthherapie dar. Somit eröffnet die hier etablierte Methodik eine gute Möglichkeit, für immuntherapeutische Zwecke nutzbare TZR zu generieren und zu isolieren. Einsatzmöglichkeiten bieten sich auf dem Gebiet der Tumorthherapie als auch bei der Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen, indem die TZR bei letzter Krankheitsgruppe statt in Effektor-T-Zellen in regulatorische T-Zellen transferiert werden.

Für eine schnellere Analyse TTA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen wäre es sehr hilfreich, die T-Zellklone *in vitro* in größerem Umfang expandieren zu können. Hier bleiben einige Optimierungsmöglichkeiten offen. So wurden beispielsweise mehr PBL spezifisch mit TTA-exprimierenden DZ für die 12 Stunden später erfolgte Klonierung stimuliert, als tatsächlich sortiert wurden. Die restlichen PBL, die nicht auf CD137⁺ sortiert wurden, könnten bestrahlt und als Stimulatorzellen den CD8⁺ T-Zellklonen zugesetzt werden. Auf diese Weise würde die viel diskutierte essentielle CD4⁺ T-Zellhilfe für die CD8⁺ T-Zellklonexpansion erhalten bleiben.

Auf der anderen Seite bewies die Versuchsdurchführung im NSG-Mausmodell die Überlegenheit der CrossTAG-gekoppelten *ivt*-mRNS hinsichtlich der CD8⁺ T-Zellinduktion. Folgt man dem „dynamischen Modell der Drei-Zell (DZ, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen)-Interaktion“ (Ahmed et al., 2012) könnte der Einsatz der CrossTAG-Sequenzen in der DZ-Vakzine den tumorthérapeutischen Effekt in Patienten verbessern, da durch die Kreuzpräsentation auf MHC-II ebenfalls CD4⁺ T-Zellen an der Tumorabwehr beteiligt sein würden. Der Beitrag der CD4⁺ T-Zellen bestünde hierbei nicht zwangsläufig aus der direkten Erkennung der Tumorzellen, sondern, wie bereits diskutiert, aus der indirekten oder direkten T-Zellhilfe für (Gedächtnis-) CD8⁺ T-Zellen. Auf diese Weise könnten CD4⁺ T-Zellen auch bei der Eliminierung von MHC-II-negativen Tumoren eine wichtige Rolle spielen. Durch einen etwas modifizierten Versuchsansatz im NSG-Mausmodell könnte dies getestet werden, indem zusätzlich zu der PBMZ-Rekonstitution sowie DZ-Vakzinierung eine Tumoralast durch Injektion von MHC-II-positiven oder -negativen Tumorzellen simuliert wird. Somit würde eine den Patienten äquivalente Situation geschaffen und es könnte überprüft werden, ob eine Vakzinierung mit CrossTAG-*ivt*-mRNS-transfizierten DZ im Vergleich zu DZ ohne CrossTAG-Transfektion besser in der Lage sind, den Tumor abzustößen.

Des Weiteren wurde grundsätzlich in dem *In-vivo*-Modell nicht direkt gezeigt, dass in den

CrossTA_g-Gruppen eine Melan-A-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort induziert wurde, wodurch die gesteigerte Proliferation von Melan-A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ermöglicht wurde. Um dies nachzuweisen, könnte man anhand eines MHC-II-Melan-A-Tetramers den Anteil an spezifischen CD4⁺ T-Zellen überprüfen. Für den tatsächlichen Nachweis einer essentiellen CD4⁺ T-Zellhilfe, die durch CrossTA_g-Sequenzen induziert wird, müssten beispielsweise die CD4⁺ T-Zellen vor der ersten Vakzinierung mit CrossTA_g-Melan-A-ivt-mRNS-transfizierten mDZ depletiert werden. Sollte sich dann ein ähnliches Bild wie in der Gruppe mit mDZ ohne CrossTA_g-Sequenzen ergeben, könnte man dies auf die fehlende CD4⁺ T-Zellhilfe zurückführen.

Das Wissen über das Immunsystem wächst mit der Zahl der Wissenschaftler, die in diesem Bereich forschen, immer schneller und dennoch kratzen wir noch immer nur an der Oberfläche der vielschichtigen Regulationsmechanismen, die dem komplexen System der Immunabwehr zu Grunde liegen. Viele verschiedene Tumortherapieansätze stehen mittlerweile zur Verfügung. Bedenkt man jedoch die vielen Krebsursachen und Tumorflechtmöglichkeiten, so haben die Therapieansätze für sich allein genommen vermutlich wenig Erfolgchancen für eine lang anhaltende und umfassende Heilung von Krebspatienten. Daher ist z.B. die Kombination verschiedener immunotheapeutischer Ansätze wahrscheinlich aussichtsreicher. So könnte der parallele Einsatz der in dieser Arbeit zugrunde liegenden Therapieansätze – der adoptiver T-Zelltransfer und die DZ-Vakzinierung – zu einer effizienteren Bekämpfung von Tumoren führen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aarntzen, E.H., Schreibelt, G., Bol, K., Lesterhuis, W.J., Croockewit, A.J., de Wilt, J.H., van Rossum, M.M., Blokx, W.A., Jacobs, J.F., Duiveman-de Boer, T., et al. (2012). "Vaccination with mRNA-electroporated dendritic cells induces robust tumor antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells responses in stage III and IV melanoma patients." *Clin Cancer Res* **18**(19): 5460-5470.
- Adams, M., Jasani, B. und Fiander, A. (2007). "Human papilloma virus (HPV) prophylactic vaccination: challenges for public health and implications for screening." *Vaccine* **25**(16): 3007-3013.
- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H. und Honjo, T. (1996). "Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes." *Int Immunol* **8**(5): 765-772.
- Ahmed, K.A., Wang, L., Munegowda, M.A., Mulligan, S.J., Gordon, J.R., Griebel, P. und Xiang, J. (2012). "Direct in vivo evidence of CD4+ T cell requirement for CTL response and memory via pMHC-I targeting and CD40L signaling." *J Leukoc Biol* **92**(2): 289-300.
- Alpan, R.S., Zhang, M. und Pardee, A.B. (1996). "Cell cycle-dependent expression of TAP1, TAP2, and HLA-B27 messenger RNAs in a human breast cancer cell line." *Cancer Res* **56**(19): 4358-4361.
- Anderson, G. und Takahama, Y. (2012). "Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection." *Trends Immunol* **33**(6): 256-263.
- Andrews, D.M., Maraskovsky, E. und Smyth, M.J. (2008). "Cancer vaccines for established cancer: how to make them better?" *Immunol Rev* **222**: 242-255.
- Apcher, S., Manoury, B. und Fahraeus, R. (2012). "The role of mRNA translation in direct MHC class I antigen presentation." *Curr Opin Immunol* **24**(1): 71-76.
- Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D. und Mak, T.W. (1995). "Human T-cell receptor variable gene segment families." *Immunogenetics* **42**(6): 455-500.
- Ardon, H., Van Gool, S.W., Verschuere, T., Maes, W., Fieuws, S., Sciote, R., Wilms, G., Demareel, P., Goffin, J., Van Calenbergh, F., et al. (2012). "Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the standard of care treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma: results of the HGG-2006 phase I/II trial." *Cancer Immunol Immunother* **61**(11): 2033-2044.
- Armitage, R.J., Macduff, B.M., Eisenman, J., Paxton, R. und Grabstein, K.H. (1995). "IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation." *J Immunol* **154**(2): 483-490.
- Arruda, L.B., Sim, D., Chikhlikar, P.R., Maciel, M., Jr., Akasaki, K., August, J.T. und Marques, E.T. (2006). "Dendritic cell-lysosomal-associated membrane protein (LAMP) and LAMP-1-HIV-1

- gag chimeras have distinct cellular trafficking pathways and prime T and B cell responses to a diverse repertoire of epitopes." *J Immunol* **177**(4): 2265-2275.
- Banchereau, J. und Palucka, A.K. (2005). "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." *Nat Rev Immunol* **5**(4): 296-306.
- Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Miller, J.F. und Heath, W.R. (1997). "Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help." *J Exp Med* **186**(1): 65-70.
- Bhadra, R., Gigley, J.P. und Khan, I.A. (2011). "Cutting edge: CD40-CD40 ligand pathway plays a critical CD8-intrinsic and -extrinsic role during rescue of exhausted CD8 T cells." *J Immunol* **187**(9): 4421-4425.
- Bisset, L.R., Lung, T.L., Kaelin, M., Ludwig, E. und Dubs, R.W. (2004). "Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland." *Eur J Haematol* **72**(3): 203-212.
- Biswas, S.K. und Mantovani, A. (2010). "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm." *Nat Immunol* **11**(10): 889-896.
- Boczkowski, D., Nair, S.K., Snyder, D. und Gilboa, E. (1996). "Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo." *J Exp Med* **184**(2): 465-472.
- Bonehill, A., Heirman, C., Tuyaerts, S., Michiels, A., Breckpot, K., Brasseur, F., Zhang, Y., Van Der Bruggen, P. und Thielemans, K. (2004). "Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules." *J Immunol* **172**(11): 6649-6657.
- Boudreau, J.E., Bonehill, A., Thielemans, K. und Wan, Y. (2011). "Engineering dendritic cells to enhance cancer immunotherapy." *Mol Ther* **19**(5): 841-853.
- Bourgeois, C., Rocha, B. und Tanchot, C. (2002). "A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory." *Science* **297**(5589): 2060-2063.
- Boyle, L.H., Goodall, J.C. und Gaston, J.S. (2004). "Major histocompatibility complex class I-restricted alloreactive CD4+ T cells." *Immunology* **112**(1): 54-63.
- Bürdek, M. (Dissertation Dez. 2009). "Generierung WT1-spezifischer T-Zellen und Selektion spezifischer T-Zellrezeptoren mittels transgener Expression in Jurkat-T-Zellen." *Dissertation an der LMU München*.
- Burdek, M., Spranger, S., Wilde, S., Frankenberger, B., Schendel, D.J. und Geiger, C. (2010). "Three-day dendritic cells for vaccine development: antigen uptake, processing and presentation." *J Transl Med* **8**: 90.
- Butler, M.O., Imataki, O., Yamashita, Y., Tanaka, M., Ansen, S., Berezovskaya, A., Metzler, G., Milstein, M.I., Mooney, M.M., Murray, A.P., et al. (2012). "Ex vivo expansion of human CD8+ T cells using autologous CD4+ T cell help." *PLoS one* **7**(1): e30229.
- Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A.D., De Francesco, M.A., Fiorentini, S., Peroni, L.,

- Fallacara, F., Dima, F., Balsari, A. , et al. (1997). "Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation." *Cytometry* **27**(1): 71-76.
- Celli, S., Day, M., Muller, A.J., Molina-Paris, C., Lythe, G. und Bousso, P. (2012). "How many dendritic cells are required to initiate a T-cell response?" *Blood* **120**(19): 3945-3948.
- Charo, J., Finkelstein, S.E., Grewal, N., Restifo, N.P., Robbins, P.F. und Rosenberg, S.A. (2005). "Bcl-2 overexpression enhances tumor-specific T-cell survival." *Cancer Res* **65**(5): 2001-2008.
- Chen, C., Johnston, T.D., Jeon, H., Gedaly, R., McHugh, P. und Ranjan, D. (2009). "Cyclosporine promotes epstein-barr virus-infected human B-cell transformation assayed by three correlated assay methods." *Transplant Proc* **41**(1): 366-370.
- Chen, Y. (2004). "Identification of human tumor antigens by serological expression cloning: an online review on SEREX." *Cancer Immun*
- Cheng, Y.H., Wong, E.W. und Cheng, C.Y. (2011). "Cancer/testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis." *Spermatogenesis* **1**(3): 209-220.
- Chial, H.J. (2008). "Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer." *Nat Education* **1**(1): 1-4.
- Coquet, J.M., Kyriassoudis, K., Pellicci, D.G., Besra, G., Berzins, S.P., Smyth, M.J. und Godfrey, D.I. (2007). "IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production." *J Immunol* **178**(5): 2827-2834.
- Crespo, J., Sun, H., Welling, T.H., Tian, Z. und Zou, W. (2013). "T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment." *Curr Opin Immunol* **25**(2): 214-221.
- D'Orsogna, L.J., Roelen, D.L., Doxiadis, I. und Claas, F.H. (2012). "TCR cross-reactivity and allorecognition: new insights into the immunogenetics of allorecognition." *Immunogenetics* **64**(2): 77-85.
- Dauer, M., Schad, K., Hertel, J., Junkmann, J., Bauer, C., Kiefl, R., Endres, S. und Eigler, A. (2005). "FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells." *J Immunol Methods* **302**(1-2): 145-155.
- Davis, I.D., Chen, W., Jackson, H., Parente, P., Shackleton, M., Hopkins, W., Chen, Q., Dimopoulos, N., Luke, T., Murphy, R. , et al. (2004). "Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29): 10697-10702.
- De Mitri, M.S., Cassini, R. und Bernardi, M. (2010). "Hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis: molecular oncogenic potential of clear or occult infections." *Eur J Cancer* **46**(12): 2178-2186.
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C. , et al. (1994). "Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family." *Immunogenetics* **40**(5): 360-369.

- Delecluse, H.J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C. und Hammerschmidt, W. (1999). "A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5188-5193.
- Dreher, D. und Junod, A.F. (1996). "Role of oxygen free radicals in cancer development." Eur J Cancer **32A**(1): 30-38.
- Dresch, C., Leverrier, Y., Marvel, J. und Shortman, K. (2012). "Development of antigen cross-presentation capacity in dendritic cells." Trends Immunol **33**(8): 381-388.
- Dugdale, D.C. (2012, 3. September). "Cancer." Zugriff am 12. Januar 2013 unter <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001289.htm>
- Dunn, G.P., Koebel, C.M. und Schreiber, R.D. (2006). "Interferons, immunity and cancer immunoe-diting." Nat Rev Immunol **6**(11): 836-848.
- Ehrlich, P. (1909). "Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Vortrag gehalten vor den Stu-denten der Amsterdamer Universität, Verinigung für wissenschaftliche Arbeit 1 June 1908. Printed in: P. Ehrlich. ." Beiträge zur Eperimentellen Pathologie und Chemotherapie, Akade-mische Verlagsgesellschaft, Leipzig: 118-164.
- Eichmuller, S., Usener, D., Dummer, R., Stein, A., Thiel, D. und Schadendorf, D. (2001). "Serologi-cal detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 629-634.
- Ellinger, C. (Dissertation März 2013). "Gezielte MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation für die Generie-rung und Isolierung Tumor/Testis-Antigen-spezifischer CD4+ T-Lymphozyten." Dissertation an der LMU München.
- Essand, M. und Loskog, A.S. (2013). "Genetically engineered T cells for the treatment of cancer." J Intern Med **273**(2): 166-181.
- Farrell, P.J. (2001). "Epstein-Barr virus. The B95-8 strain map." Methods Mol Biol **174**: 3-12.
- Feau, S., Arens, R., Togher, S. und Schoenberger, S.P. (2011). "Autocrine IL-2 is required for se-condary population expansion of CD8(+) memory T cells." Nat Immunol **12**(9): 908-913.
- Feau, S., Garcia, Z., Arens, R., Yagita, H., Borst, J. und Schoenberger, S.P. (2012). "The CD4(+) T-cell help signal is transmitted from APC to CD8(+) T-cells via CD27-CD70 interactions." Nat Commun **3**: 948.
- Floyd, T.L., Orr, S.B., Coley, S.M., Hanna, S.S., Wagener, M.E., Kirk, A.D., Larsen, C.P. und Ford, M.L. (2010). "High-frequency alloreactive T cells augment effector function of low-frequency CD8+ T-cell responses under CD28/CD154 blockade." Transplantation **89**(10): 1208-1217.
- Frankenberger, B. und Schendel, D.J. (2012). "Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy." Eur J Cell Biol **91**(1): 53-58.
- Freitas, M., Malheiros, S., Stavale, J.N., Biassi, T.P., Zamuner, F.T., de Souza Begnami, M., Soa-res, F.A. und Vettore, A.L. (2013). "Expression of cancer/testis antigens is correlated with improved survival in glioblastoma." Oncotarget **4**(4): 636-646.

- Fried, B., Reddy, A. und Mayer, D. (2011). "Helminths in human carcinogenesis." Cancer Lett **305**(2): 239-249.
- Fujinami, R.S., von Herrath, M.G., Christen, U. und Whitton, J.L. (2006). "Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease." Clin Microbiol Rev **19**(1): 80-94.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vacchelli, E., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L. und Kroemer, G. (2012). "Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy." Oncoimmunology **1**(7): 1111-1134.
- Gao, F.G., Khammanivong, V., Liu, W.J., Leggatt, G.R., Frazer, I.H. und Fernando, G.J. (2002). "Antigen-specific CD4+ T-cell help is required to activate a memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell." Cancer Res **62**(22): 6438-6441.
- Gary, R., Voelkl, S., Palmisano, R., Ullrich, E., Bosch, J.J. und Mackensen, A. (2012). "Antigen-specific transfer of functional programmed death ligand 1 from human APCs onto CD8+ T cells via trogocytosis." J Immunol **188**(2): 744-752.
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C. , et al. (2011). "A human memory T cell subset with stem cell-like properties." Nat Med **17**(10): 1290-1297.
- Gattinoni, L., Powell, D.J., Jr., Rosenberg, S.A. und Restifo, N.P. (2006). "Adoptive immunotherapy for cancer: building on success." Nat Rev Immunol **6**(5): 383-393.
- Gilboa, E. (1999). "The makings of a tumor rejection antigen." Immunity **11**(3): 263-270.
- Gjerstorff, M.F. und Ditzel, H.J. (2008). "An overview of the GAGE cancer/testis antigen family with the inclusion of newly identified members." Tissue Antigens **71**(3): 187-192.
- Gjerstorff, M.F., Johansen, L.E., Nielsen, O., Kock, K. und Ditzel, H.J. (2006). "Restriction of GAGE protein expression to subpopulations of cancer cells is independent of genotype and may limit the use of GAGE proteins as targets for cancer immunotherapy." Br J Cancer **94**(12): 1864-1873.
- Goldstein, M.J., Kohrt, H.E., Houot, R., Varghese, B., Lin, J.T., Swanson, E. und Levy, R. (2012). "Adoptive cell therapy for lymphoma with CD4 T cells depleted of CD137-expressing regulatory T cells." Cancer Res **72**(5): 1239-1247.
- Gotter, J., Brors, B., Hergenbahn, M. und Kyewski, B. (2004). "Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters." J Exp Med **199**(2): 155-166.
- Govers, C., Sebestyen, Z., Coccoris, M., Willemsen, R.A. und Debets, R. (2010). "T cell receptor gene therapy: strategies for optimizing transgenic TCR pairing." Trends Mol Med **16**(2): 77-87.
- Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., Ahdieh, M. , et al. (1994). "Cloning of a T cell growth factor

- that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor." Science **264**(5161): 965-968.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russel, W.C. und Nairn, R. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74
- Grote, A., Hiller, K., Scheer, M., Munch, R., Nortemann, B., Hempel, D.C. und Jahn, D. (2005). "JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W526-531.
- Hailemichael, Y., Dai, Z., Jaffarzad, N., Ye, Y., Medina, M.A., Huang, X.F., Dorta-Estremera, S.M., Greeley, N.R., Nitti, G., Peng, W. , et al. (2013). "Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8(+) T cell sequestration, dysfunction and deletion." Nat Med **19**(4): 465-472.
- Hajdu, S.I. (2011). "A note from history: landmarks in history of cancer, part 1." Cancer **117**(5): 1097-1102.
- Ho, W.Y., Nguyen, H.N., Wolfl, M., Kuball, J. und Greenberg, P.D. (2006). "In vitro methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naive repertoire." J Immunol Methods **310**(1-2): 40-52.
- Hopkins, R.A. und Connolly, J.E. (2012). "The specialized roles of immature and mature dendritic cells in antigen cross-presentation." Immunol Res **53**(1-3): 91-107.
- Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K. , et al. (2002). "NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells." Blood **100**(9): 3175-3182.
- Jager, E. und Knuth, A. (2012). "The discovery of cancer/testis antigens by autologous typing with T cell clones and the evolution of cancer vaccines." Cancer Immun **12**: 6.
- Javorovic, M., Wilde, S., Zobywalski, A., Noessner, E., Lennerz, V., Wolfel, T. und Schendel, D.J. (2008). "Inhibitory effect of RNA pool complexity on stimulatory capacity of RNA-pulsed dendritic cells." J Immunother **31**(1): 52-62.
- Jobs, S. (2005, Juni). „How to live before you die.“ Zugriff am 15. Juni 2013 unter http://www.ted.com/talks/steve_jobs_how_to_live_before_you_die.html
- Johnson, L.A., Morgan, R.A., Dudley, M.E., Cassard, L., Yang, J.C., Hughes, M.S., Kammula, U.S., Royal, R.E., Sherry, R.M., Wunderlich, J.R. , et al. (2009). "Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen." Blood **114**(3): 535-546.
- Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. und Enk, A.H. (1997). "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions." Eur J Immunol **27**(12): 3135-3142.
- Jungbluth, A.A., Busam, K.J., Kolb, D., Iversen, K., Coplan, K., Chen, Y.T., Spagnoli, G.C. und Old,

- L.J. (2000). "Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer." Int J Cancer **85**(4): 460-465.
- Kakimi, K., Isobe, M., Uenaka, A., Wada, H., Sato, E., Doki, Y., Nakajima, J., Seto, Y., Yamatsuji, T., Naomoto, Y., et al. (2011). "A phase I study of vaccination with NY-ESO-1f peptide mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen." Int J Cancer **129**(12): 2836-2846.
- Kawai, A., Woodruff, J., Healey, J.H., Brennan, M.F., Antonescu, C.R. und Ladanyi, M. (1998). "SY-T-SSX gene fusion as a determinant of morphology and prognosis in synovial sarcoma." N Engl J Med **338**(3): 153-160.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R. und Hammerschmidt, W. (1995). "Immortalization of human primary B lymphocytes in vitro with DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(13): 5875-5879.
- Kirkwood, J.M., Butterfield, L.H., Tarhini, A.A., Zarour, H., Kalinski, P. und Ferrone, S. (2012). "Immunotherapy of cancer in 2012." CA Cancer J Clin **62**(5): 309-335.
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J. und Schreiber, R.D. (2007). "Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state." Nature **450**(7171): 903-907.
- Krangel, M.S. (2009). "Mechanics of T cell receptor gene rearrangement." Curr Opin Immunol **21**(2): 133-139.
- Kurashige, T., Noguchi, Y., Saika, T., Ono, T., Nagata, Y., Jungbluth, A., Ritter, G., Chen, Y.T., Stockert, E., Tsushima, T., et al. (2001). "Ny-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade." Cancer Res **61**(12): 4671-4674.
- Larange, A., Antonios, D., Pallardy, M. und Kerdine-Romer, S. (2009). "TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation." J Leukoc Biol **85**(4): 673-683.
- Larosa, D.F. und Orange, J.S. (2008). "1. Lymphocytes." J Allergy Clin Immunol **121**(2 Suppl): S364-369; quiz S412.
- Law, R.H., Lukoyanova, N., Voskoboinik, I., Caradoc-Davies, T.T., Baran, K., Dunstone, M.A., D'Angelo, M.E., Orlova, E.V., Coulibaly, F., Verschoor, S., et al. (2010). "The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin." Nature **468**(7322): 447-451.
- Lee, S.J., Shin, J.W., Park, B.R., Kim, C.J., Jung, S.W., Kim, B., Jeong, I.D., Bang, S.J. und Park, N.H. (2012). "The expression kinetics of CD137 in chronic hepatitis C patients treated with pegylated-interferon and ribavirin." Scand J Gastroenterol **47**(5): 601-606.
- Lefranc, M.P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., Lane, J., et al. (2009). "IMGT, the international ImMunoGeneTics information system." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D1006-1012.

- Leisegang, M., Engels, B., Meyerhuber, P., Kieback, E., Sommermeyer, D., Xue, S.A., Reuss, S., Stauss, H. und Uckert, W. (2008). "Enhanced functionality of T cell receptor-redirected T cells is defined by the transgene cassette." *J Mol Med (Berl)* **86**(5): 573-583.
- Leisegang, M., Wilde, S., Spranger, S., Milosevic, S., Frankenberger, B., Uckert, W. und Schendel, D.J. (2010). "MHC-restricted fratricide of human lymphocytes expressing survivin-specific transgenic T cell receptors." *J Clin Invest* **120**(11): 3869-3877.
- Liao, W., Lin, J.X. und Leonard, W.J. (2011). "IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation." *Curr Opin Immunol* **23**(5): 598-604.
- Lim, S.H., Zhang, Y. und Zhang, J. (2012). "Cancer-testis antigens: the current status on antigen regulation and potential clinical use." *Am J Blood Res* **2**(1): 29-35.
- Lozzio, C.B. und Lozzio, B.B. (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." *Blood* **45**(3): 321-334.
- Marr, L.A., Gilham, D.E., Campbell, J.D. und Fraser, A.R. (2012). "Immunology in the clinic review series; focus on cancer: double trouble for tumours: bi-functional and redirected T cells as effective cancer immunotherapies." *Clin Exp Immunol* **167**(2): 216-225.
- Martini, M., Testi, M.G., Pasetto, M., Picchio, M.C., Innamorati, G., Mazzocco, M., Ugel, S., Cingarlini, S., Bronte, V., Zanovello, P. , et al. (2010). "IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer." *Vaccine* **28**(20): 3548-3557.
- Mascarell, L. und Truffa-Bachi, P. (2003). "New aspects of cyclosporin a mode of action: from gene silencing to gene up-regulation." *Mini Rev Med Chem* **3**(3): 205-214.
- Maynard, S., Schurman, S.H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N.C. und Bohr, V.A. (2009). "Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging." *Carcinogenesis* **30**(1): 2-10.
- McCaughy, T.M., Etzensperger, R., Alag, A., Tai, X., Kurtulus, S., Park, J.H., Grinberg, A., Love, P., Feigenbaum, L., Erman, B. , et al. (2012). "Conditional deletion of cytokine receptor chains reveals that IL-7 and IL-15 specify CD8 cytotoxic lineage fate in the thymus." *J Exp Med* **209**(12): 2263-2276.
- Milani, V., Frankenberger, B., Heinz, O., Brandl, A., Ruhland, S., Issels, R.D. und Noessner, E. (2005). "Melanoma-associated antigen tyrosinase but not Melan-A/MART-1 expression and presentation dissociate during the heat shock response." *Int Immunol* **17**(3): 257-268.
- Miller, G. und Lipman, M. (1973). "Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(1): 190-194.
- Miller, R.E., Jones, J., Le, T., Whitmore, J. et al. und Lynch, D.H. (2002). "4-1BB-specific monoclonal antibody promotes the generation of tumor-specific immune responses by direct activation of CD8 T cells in a CD40-dependent manner." *J Immunol* **169**(4): 1792-1800.

- Milosevic, S., Behrends, U., Adhikary, D. und Mautner, J. (2006). "Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigens and epitopes of the Epstein-Barr virus by a novel bacterial expression cloning approach." *J Virol* **80**(21): 10357-10364.
- Moosmann, A., Khan, N., Cobbold, M., Zentz, C., Delecluse, H.J., Hollweck, G., Hislop, A.D., Blake, N.W., Croom-Carter, D., Wollenberg, B. , et al. (2002). "B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells." *Blood* **100**(5): 1755-1764.
- Morgan, R.A., Chinnasamy, N., Abate-Daga, D., Gros, A., Robbins, P.F., Zheng, Z., Dudley, M.E., Feldman, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M. , et al. (2013). "Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy." *J Immunother* **36**(2): 133-151.
- Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P. , et al. (2006). "Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes." *Science* **314**(5796): 126-129.
- Mortenson, E.D., Park, S., Jiang, Z., Wang, S. und Fu, Y.X. (2013). "Effective anti-neu-initiated antitumor responses require the complex role of CD4+ T cells." *Clin Cancer Res* **19**(6): 1476-1486.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Nagy, Z.A. (2012). "Alloreactivity: an old puzzle revisited." *Scand J Immunol* **75**(5): 463-470.
- Naito, T., Tanaka, H., Naoe, Y. und Taniuchi, I. (2011). "Transcriptional control of T-cell development." *Int Immunol* **23**(11): 661-668.
- Nakagawa, K., Noguchi, Y., Uenaka, A., Sato, S., Okumura, H., Tanaka, M., Shimono, M., Ali Eldib, A.M., Ono, T., Ohara, N. , et al. (2005). "XAGE-1 expression in non-small cell lung cancer and antibody response in patients." *Clin Cancer Res* **11**(15): 5496-5503.
- Nicholaou, T., Chen, W., Davis, I.D., Jackson, H.M., Dimopoulos, N., Barrow, C., Browning, J., Macgregor, D., Williams, D., Hopkins, W. , et al. (2011). "Immunoediting and persistence of antigen-specific immunity in patients who have previously been vaccinated with NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX." *Cancer Immunol Immunother* **60**(11): 1625-1637.
- Nishikawa, H., Maeda, Y., Ishida, T., Gnjjatic, S., Sato, E., Mori, F., Sugiyama, D., Ito, A., Fukumori, Y., Utsunomiya, A. , et al. (2012). "Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma." *Blood* **119**(13): 3097-3104.
- Obst, R., Munz, C., Stevanovic, S. und Rammensee, H.G. (1998). "Allo- and self-restricted cytotoxic T lymphocytes against a peptide library: evidence for a functionally diverse allorestricted T cell repertoire." *Eur J Immunol* **28**(8): 2432-2443.
- Ohue, Y., Eikawa, S., Okazaki, N., Mizote, Y., Isobe, M., Uenaka, A., Fukuda, M., Old, L.J., Oka, M. und Nakayama, E. (2012). "Spontaneous antibody, and CD4 and CD8 T-cell responses

- against XAGE-1b (GAGED2a) in non-small cell lung cancer patients." *Int J Cancer* **131**(5): E649-658.
- Pagano, J.S., Blaser, M., Buendia, M.A., Damania, B., Khalili, K., Raab-Traub, N. und Roizman, B. (2004). "Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation." *Semin Cancer Biol* **14**(6): 453-471.
- Park, J.H., Adoro, S., Lucas, P.J., Sarafova, S.D., Alag, A.S., Doan, L.L., Erman, B., Liu, X., Ellmeier, W., Bosselut, R. , et al. (2007). "'Coreceptor tuning': cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR." *Nat Immunol* **8**(10): 1049-1059.
- Park, S.J., Kim, H.J., Lee, J.S., Cho, H.R. und Kwon, B. (2012). "Reverse signaling through the costimulatory ligand, CD137L, as a critical mediator of sterile inflammation." *Mol Cells* **33**(6): 533-537.
- Pegram, H.J., Lee, J.C., Hayman, E.G., Imperato, G.H., Tedder, T.F., Sadelain, M. und Brentjens, R.J. (2012). "Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning." *Blood* **119**(18): 4133-4141.
- Petrova, G., Ferrante, A. und Gorski, J. (2012). "Cross-reactivity of T cells and its role in the immune system." *Crit Rev Immunol* **32**(4): 349-372.
- Pham-Huy, L.A., He, H. und Pham-Huy, C. (2008). "Free radicals, antioxidants in disease and health." *Int J Biomed Sci* **4**(2): 89-96.
- Pittet, M.J., Valmori, D., Dunbar, P.R., Speiser, D.E., Lienard, D., Lejeune, F., Fleischhauer, K., Cerundolo, V., Cerottini, J.C. und Romero, P. (1999). "High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals." *J Exp Med* **190**(5): 705-715.
- Pope, J.H., Horne, M.K. und Scott, W. (1968). "Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus." *Int J Cancer* **3**(6): 857-866.
- Restifo, N.P., Dudley, M.E. und Rosenberg, S.A. (2012). "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response." *Nat Rev Immunol* **12**(4): 269-281.
- Reuss, S., Biese, P., Cosset, F.L., Takeuchi, Y. und Uckert, W. (2007). "Suspension packaging cell lines for the simplified generation of T-cell receptor encoding retrovirus vector particles." *Gene Ther* **14**(7): 595-603
- Ribas, A., Butterfield, L.H., Glaspy, J.A. und Economou, J.S. (2002). "Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells." *Curr Gene Ther* **2**(1): 57-78.
- Rivoltini, L., Barracchini, K.C., Viggiano, V., Kawakami, Y., Smith, A., Mixon, A., Restifo, N.P., Topalian, S.L., Simonis, T.B., Rosenberg, S.A. , et al. (1995). "Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes." *Cancer Res* **55**(14): 3149-3157.

- Robbins, P.F., Morgan, R.A., Feldman, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Nahvi, A.V., Helman, L.J., Mackall, C.L. , et al. (2011). "Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1." *J Clin Oncol* **29**(7): 917-924.
- Robert Koch-Institut (Hrgs.) (2012). „Krebs in Deutschland 2007/2008.“ Zugriff am 12. Januar 2013 unter http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/Doc/krebs_in_deutschland_2012.pdf
- Roithmaier, S., Haydon, A.M., Loi, S., Esmore, D., Griffiths, A., Bergin, P., Williams, T.J. und Schwarz, M.A. (2007). "Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience." *J Heart Lung Transplant* **26**(8): 845-849.
- Rosenberg, S.A. und Dudley, M.E. (2009). "Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma." *Curr Opin Immunol* **21**(2): 233-240.
- Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., Yang, J.C., Morgan, R.A. und Dudley, M.E. (2008). "Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* **8**(4): 299-308.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C. und Restifo, N.P. (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." *Nat Med* **10**(9): 909-915.
- Rous, P. (1910). "An Experimental Comparison of Transplanted Tumor and a Transplanted Normal Tissue Capable of Growth." *J Exp Med* **12**(3): 344-366.
- Sadanaga, N., Nagashima, H., Mashino, K., Tahara, K., Yamaguchi, H., Ohta, M., Fujie, T., Tanaka, F., Inoue, H., Takesako, K. , et al. (2001). "Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas." *Clin Cancer Res* **7**(8): 2277-2284.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis T. (2000). Molecular cloning, a laboratory manual. Third edition. *Cold Spring Harb Lab Press, New York*.
- Sandau, M.M., Kohlmeier, J.E., Woodland, D.L. und Jameson, S.C. (2010). "IL-15 regulates both quantitative and qualitative features of the memory CD8 T cell pool." *J Immunol* **184**(1): 35-44.
- Sato, S., Noguchi, Y., Ohara, N., Uenaka, A., Shimono, M., Nakagawa, K., Koizumi, F., Ishida, T., Yoshino, T., Shiratori, Y. , et al. (2007). "Identification of XAGE-1 isoforms: predominant expression of XAGE-1b in testis and tumors." *Cancer Immun* **7**: 5.
- Saunders, P.A., Hendrycks, V.R., Lidinsky, W.A. und Woods, M.L. (2005). "PD-L2:PD-1 involvement in T cell proliferation, cytokine production, and integrin-mediated adhesion." *Eur J Immunol* **35**(12): 3561-3569.
- Scanlan, M.J., Simpson, A.J. und Old, L.J. (2004). "The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary." *Cancer Immun* **4**: 1.
- Schendel, D.J. (2012). "Is it time to abandon RHAMM/HMMR as a candidate antigen for immunotherapy of acute myeloid leukemia?" *Haematologica* **97**(10): 1454-1455.

- Schendel, D.J. und Frankenberger, B. (2013). "Limitations for TCR gene therapy by MHC-restricted fratricide and TCR-mediated hematopoietic stem cell toxicity." Oncoimmunology **2**(1): e22410.
- Schluns, K.S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X.X. und Lefrancois, L. (2002). "Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells." J Immunol **168**(10): 4827-4831.
- Schreiber, R.D., Old, L.J. und Smyth, M.J. (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." Science **331**(6024): 1565-1570.
- Seliger, B. (2008). "Different regulation of MHC class I antigen processing components in human tumors." J Immunotoxicol **5**(4): 361-367.
- Senovilla, L., Vitale, I., Martins, I., Tailler, M., Pailleret, C., Michaud, M., Galluzzi, L., Adjemian, S., Kepp, O., Niso-Santano, M., et al. (2012). "An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy." Science **337**(6102): 1678-1684.
- Sette, A., Vitiello, A., Rehman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W.M., Melief, C.J., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., et al. (1994). "The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes." J Immunol **153**(12): 5586-5592.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. und Schreiber, R.D. (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-1111.
- Shao, H., Zhang, W., Hu, Q., Wu, F., Shen, H. und Huang, S. (2010). "TCR mispairing in genetically modified T cells was detected by fluorescence resonance energy transfer." Mol Biol Rep **37**(8): 3951-3956.
- Shin, S., El-Diwany, R., Schaffert, S., Adams, E.J., Garcia, K.C., Pereira, P. und Chien, Y.H. (2005). "Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors." Science **308**(5719): 252-255.
- Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., et al. (2005). "Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells." J Immunol **174**(10): 6477-6489.
- Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Schweitzer, I.B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T.V., Greiner, D.L., et al. (1995). "Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice." J Immunol **154**(1): 180-191.
- Simson, L., Ellyard, J.I., Dent, L.A., Matthaei, K.I., Rothenberg, M.E., Foster, P.S., Smyth, M.J. und Parish, C.R. (2007). "Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance." J Immunol **178**(7): 4222-4229.
- Sommermeier, D., Neudorfer, J., Weinhold, M., Leisegang, M., et al. (2006). "Designer T cells by T cell receptor replacement." Eur J Immunol **36**(11): 3052-3059.

- Spranger, S., Frankenberger, B. und Schendel, D.J. (2012). "NOD/scid IL-2Rg(null) mice: a preclinical model system to evaluate human dendritic cell-based vaccine strategies in vivo." J Transl Med **10**: 30.
- Spranger, S., Javorovic, M., Burdek, M., Wilde, S., Mosetter, B., Tippmer, S., Bigalke, I., Geiger, C., Schendel, D.J. und Frankenberger, B. (2010). "Generation of Th1-polarizing dendritic cells using the TLR7/8 agonist CL075." J Immunol **185**(1): 738-747.
- Steinle, A., Reinhardt, C., Jantzer, P. und Schendel, D.J. (1995). "In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for maintenance of an oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex." J Exp Med **181**(2): 503-513.
- Steinman, R.M. (2012). "Decisions about dendritic cells: past, present, and future." Annu Rev Immunol **30**: 1-22.
- Strobel, I., Berchtold, S., Gotze, A., Schulze, U., Schuler, G. und Steinkasserer, A. (2000). "Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes." Gene Ther **7**(23): 2028-2035.
- Suri, A., Saini, S., Sinha, A., Agarwal, S., Verma, A., Parashar, D., Singh, S., Gupta, N. und Jagdish, N. (2012). "Cancer testis antigens: A new paradigm for cancer therapy." Oncoimmunology **1**(7): 1194-1196.
- Suso, E.M., Dueland, S., Rasmussen, A.M., Vetthus, T., Aamdal, S., Kvalheim, G. und Gaudernack, G. (2011). "hTERT mRNA dendritic cell vaccination: complete response in a pancreatic cancer patient associated with response against several hTERT epitopes." Cancer Immunol Immunother **60**(6): 809-818.
- Takahama, Y. (2006). "Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection." Nat Rev Immunol **6**(2): 127-135.
- Thibult, M.L., Mamessier, E., Gertner-Dardenne, J., Pastor, S., Just-Landi, S., Xerri, L., Chetaille, B. und Olive, D. (2013). "PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation." Int Immunol **25**(2): 129-137.
- Thomas, S., Stauss, H.J. und Morris, E.C. (2010). "Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer." Immunology **129**(2): 170-177.
- Thomas, S., Xue, S.A., Bangham, C.R., Jakobsen, B.K., Morris, E.C. und Stauss, H.J. (2011). "Human T cells expressing affinity-matured TCR display accelerated responses but fail to recognize low density of MHC-peptide antigen." Blood **118**(2): 319-329.
- Ting, J.P. und Trowsdale, J. (2002). "Genetic control of MHC class II expression." Cell **109 Suppl**: S21-33.
- Torres, L., Lisboa, S., Cerveira, N., Lopes, J.M., Lopes, C. und Teixeira, M.R. (2008). "Cryptic chromosome rearrangement resulting in SYT-SSX2 fusion gene in a monophasic synovial sarcoma." Cancer Genet Cytogenet **187**(1): 45-49.

- Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **3**(2): 133-146.
- Ueda, T., Tsuji, K., Yoshino, H., Ebihara, Y., Yagasaki, H., Hisakawa, H., Mitsui, T., Manabe, A., Tanaka, R., Kobayashi, K., et al. (2000). "Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor." J Clin Invest **105**(7): 1013-1021.
- Valmori, D., Dutoit, V., Lienard, D., Rimoldi, D., Pittet, M.J., Champagne, P., Ellefsen, K., Sahin, U., Speiser, D., Lejeune, F., et al. (2000). "Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients." Cancer Res **60**(16): 4499-4506.
- Van Brussel, I., Berneman, Z.N. und Cools, N. (2012). "Optimizing dendritic cell-based immunotherapy: tackling the complexity of different arms of the immune system." Mediators Inflamm **2012**: 690643.
- van der Burg, S.H., Visseren, M.J., Brandt, R.M., Kast, W.M. und Melief, C.J. (1996). "Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability." J Immunol **156**(9): 3308-3314.
- van Loenen, M.M., de Boer, R., Hagedoorn, R.S., Jankipersadsing, V., Amir, A.L., Falkenburg, J.H. und Heemskerk, M.H. (2013). "Multi-cistronic vector encoding optimized safety switch for adoptive therapy with T-cell receptor-modified T cells." Gene Ther
- Van Nuffel, A.M., Benteyn, D., Wilgenhof, S., Corthals, J., Heirman, C., Neyns, B., Thielemans, K. und Bonehill, A. (2012a). "Intravenous and intradermal TriMix-dendritic cell therapy results in a broad T-cell response and durable tumor response in a chemorefractory stage IV-M1c melanoma patient." Cancer Immunol Immunother **61**(7): 1033-1043.
- Van Nuffel, A.M., Benteyn, D., Wilgenhof, S., Pierret, L., Corthals, J., et al. (2012b). "Dendritic cells loaded with mRNA encoding full-length tumor antigens prime CD4+ and CD8+ T cells in melanoma patients." Mol Ther **20**(5): 1063-1074.
- Van Tendeloo, V.F., Van de Velde, A., Van Driessche, A., Cools, N., Anguille, et al. (2010). "Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(31): 13824-13829.
- Vari, F. und Hart, D.N. (2004). "Loading DCs with Ag." Cytotherapy **6**(2): 111-121.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D. und Smyth, M.J. (2011). "Natural innate and adaptive immunity to cancer." Annu Rev Immunol **29**: 235-271.
- Vinay, D.S. und Kwon, B.S. (2012). "Immunotherapy of cancer with 4-1BB." Mol Cancer Ther **11**(5): 1062-1070.
- Walz, G., Zanker, B., Melton, L.B., Suthanthiran, M. und Strom, T.B. (1990). "Possible association of the immunosuppressive and B cell lymphoma-promoting properties of cyclosporine." Transplantation **49**(1): 191-194.

- Wang, J., Guo, Z., Dong, Y., Kim, O., Hart, J., Adams, A., Larsen, C.P., Mittler, R.S. und Newell, K.A. (2003). "Role of 4-1BB in allograft rejection mediated by CD8+ T cells." Am J Transplant **3**(5): 543-551.
- Wang, R.F., Wang, X., Atwood, A.C., Topalian, S.L. und Rosenberg, S.A. (1999). "Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen." Science **284**(5418): 1351-1354.
- Watanabe, K., Suzuki, S., Kamei, M., Toji, S., Kawase, T., Takahashi, T., Kuzushima, K. und Akatsuka, Y. (2008). "CD137-guided isolation and expansion of antigen-specific CD8 cells for potential use in adoptive immunotherapy." Int J Hematol **88**(3): 311-320.
- Watts, C. (2004). "The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules." Nat Immunol **5**(7): 685-692.
- Wehler, T.C., Nonn, M., Brandt, B., Britten, C.M., Grone, M., et al. (2007). "Targeting the activation-induced antigen CD137 can selectively deplete alloreactive T cells from antileukemic and antitumor donor T-cell lines." Blood **109**(1): 365-373.
- Weide, B., Zelba, H., Derhovanessian, E., Pflugfelder, A., Eigentler, et al. (2012). "Functional T cells targeting NY-ESO-1 or Melan-A are predictive for survival of patients with distant melanoma metastasis." J Clin Oncol **30**(15): 1835-1841.
- West, E.E., Jin, H.T., Rasheed, A.U., Penaloza-Macmaster, P., Ha, S.J., Tan, W.G., Youngblood, B., Freeman, G.J., Smith, K.A. und Ahmed, R. (2013). "PD-L1 blockade synergizes with IL-2 therapy in reinvigorating exhausted T cells." J Clin Invest **123**(6): 2604-2615.
- WHO (Hrgs.) (2011, Mai). „Causes of Death 2008 summary tables.“ Zugriff am 12. Januar 2013 unter: http://www.who.int/entity/gho/mortality_burden_disease/global_burden_disease_DTH_6_2008.xls
- WHO (Hrgs.) (2013, Januar). „Cancer.“ Zugriff am 12. Januar 2013 unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Wiesel, M. und Oxenius, A. (2012). "From crucial to negligible: functional CD8(+) T-cell responses and their dependence on CD4(+) T-cell help." Eur J Immunol **42**(5): 1080-1088.
- Wilde, S., Sommermeyer, D., Frankenberger, B., Schiemann, M., Milosevic, S., Spranger, S., Pohla, H., Uckert, W., Busch, D.H. und Schendel, D.J. (2009). "Dendritic cells pulsed with RNA encoding allogeneic MHC and antigen induce T cells with superior antitumor activity and higher TCR functional avidity." Blood **114**(10): 2131-2139.
- Wilde, S., Sommermeyer, D., Leisegang, M., Frankenberger, B., Mosetter, B., Uckert, W. und Schendel, D.J. (2012). "Human antitumor CD8+ T cells producing Th1 polycytokines show superior antigen sensitivity and tumor recognition." J Immunol **189**(2): 598-605.
- Wolfel, T., Hauer, M., Klehmann, E., Brichard, V., Ackermann, B., Knuth, A., Boon, T. und Meyer Zum Buschenfelde, K.H. (1993). "Analysis of antigens recognized on human melanoma cells by A2-restricted cytolytic T lymphocytes (CTL)." Int J Cancer **55**(2): 237-244.

- Wolfl, M., Kuball, J., Eyrich, M., Schlegel, P.G. und Greenberg, P.D. (2008). "Use of CD137 to study the full repertoire of CD8+ T cells without the need to know epitope specificities." Cytometry **73**(11): 1043-1049.
- Wolfl, M., Kuball, J., Ho, W.Y., Nguyen, H., Manley, T.J., Bleakley, M. und Greenberg, P.D. (2007). "Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities." Blood **110**(1): 201-210.
- Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho, K.R., August, J.T. und Pardoll, D.M. (1995). "Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11671-11675.
- Wucherpfennig, K.W., Gagnon, E., Call, M.J., Huseby, E.S. und Call, M.E. (2010). "Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(4): a005140.
- Xiao, Z., Mescher, M.F. und Jameson, S.C. (2007). "Detuning CD8 T cells: down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation." J Exp Med **204**(11): 2667-2677.
- Xydia, M., Ge, Y., Quitsch, U. und Beckhove, P. (2011). "CD40L co-stimulation from CD8+ to CD4+ effector memory T cells supports CD4+ expansion." Immunol Cell Biol **89**(6): 670-680.
- Yamaguchi, H., Tanaka, F., Ohta, M., Inoue, H. und Mori, M. (2004). "Identification of HLA-A24-restricted CTL epitope from cancer-testis antigen, NY-ESO-1, and induction of a specific anti-tumor immune response." Clin Cancer Res **10**(3): 890-896.
- Yoshino, H., Ueda, T., Kawahata, M., Kobayashi, K., Ebihara, Y., et al. (2000). "Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice." Bone Marrow Transplant **26**(11): 1211-1216.
- Zendman, A.J., van Kraats, A.A., den Hollander, A.I., Weidle, U.H., Ruiter, D.J. und van Muijen, G.N. (2002a). "Characterization of XAGE-1b, a short major transcript of cancer/testis-associated gene XAGE-1, induced in melanoma metastasis." Int J Cancer **97**(2): 195-204.
- Zendman, A.J., Van Kraats, A.A., Weidle, U.H., Ruiter, D.J. und Van Muijen, G.N. (2002b). "The XAGE family of cancer/testis-associated genes: alignment and expression profile in normal tissues, melanoma lesions and Ewing's sarcoma." Int J Cancer **99**(3): 361-369.
- Zeng, G., Touloukian, C.E., Wang, X., Restifo, N.P., Rosenberg, S.A. und Wang, R.F. (2000). "Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules." J Immunol **165**(2): 1153-1159.
- Zeng, R., Spolski, R., Finkelstein, S.E., Oh, S., Kovanen, P.E., Hinrichs, C.S., Pise-Masison, C.A., Radonovich, M.F., Brady, J.N., Restifo, N.P., et al. (2005). "Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function." J Exp Med **201**(1): 139-148.

- Zhang, L. und Morgan, R.A. (2012). "Genetic engineering with T cell receptors." Adv Drug Deliv Rev **64**(8): 756-762.
- Zhao, R., Tang, B., Liu, Y. und Zhu, N. (2011). "NLS-dependent and insufficient nuclear localization of XAGE-1 splice variants." Oncol Rep **25**(4): 1083-1089.
- Zhou, D., Srivastava, R., Grummel, V., Cepok, S., Hartung, H.P. und Hemmer, B. (2006). "High throughput analysis of TCR-beta rearrangement and gene expression in single T cells." Lab Invest **86**(3): 314-321.
- Zhou, Q., Guo, A.L., Xu, C.R., An, S.J., Wang, Z., Yang, S.Q. und Wu, Y.L. (2008). "A dendritic cell-based tumour vaccine for lung cancer: full-length XAGE-1b protein-pulsed dendritic cells induce specific cytotoxic T lymphocytes in vitro." Clin Exp Immunol **153**(3): 392-400.
- Zhou, Y., Bosch, M.L. und Salgaller, M.L. (2002). "Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for the induction of antitumor immunity." J Immunother **25**(4): 289-303.
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. und Kroemer, G. (2008). "Immunological aspects of cancer chemotherapy." Nat Rev Immunol **8**(1): 59-73.
- Zitvogel, L., Tesniere, A. und Kroemer, G. (2006). "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion." Nat Rev Immunol **6**(10): 715-727.
- Zlotoff, D.A., Zhang, S.L., De Obaldia, M.E., Hess, P.R., Todd, S.P., Logan, T.D. und Bhandoola, A. (2011). "Delivery of progenitors to the thymus limits T-lineage reconstitution after bone marrow transplantation." Blood **118**(7): 1962-1970.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3d-mDZ	Mature DZ, generiert nach dem 3-Tages-Protokoll
7d-mDZ	Mature DZ, generiert nach dem 7-Tages-Protokoll
AG	Antigen
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
C-Region	Konstante Region (engl. <i>constant region</i>)
cDNS	Komplementäre DNS (engl. <i>complementary DNA</i>)
CCR	Chemokin-(CC-Motiv)-Rezeptor
CDR	engl. <i>Complementarity Determining Region</i>
Cy7	Cyanin-7
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
D-Segment	Diversifizierendes Segment
DC-LAMP	Dendritische Zellen - Lysosomal-assoziiertes Membran-Protein (LAMP3)
DC-SIGN	engl. <i>DC-specific ICAM-Grabbing Nonintegrin</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPI	Direkte Epitop-Identifizierung
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5-Trisphosphat
DZ	Dendritische Zelle
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGFR	engl. <i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>
F	Farad
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (engl. <i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreuung (engl. <i>forward scatter</i>)
GAGE-1	G Protein 1 (TT-Antigen 4.1)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HS	Humanserum

iDZ	Unreife Dendritische Zelle (engl. <i>immature dendritic cell</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMI	Institut für Molekulare Immunologie
IU	Internationale Einheit (engl. <i>international unit</i>)
Ivt-mRNS	In vitro transkribierte mRNS
J-Segment	Verbindendes Segment (engl. <i>joining segment</i>)
LAMP1	Lysosomal-assoziiertes Membran-Protein 1
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCL	Lymphoblastoide B-Zell-Linie (engl. <i>lymphoblastoid cell line</i>)
MAGE-A4	Melanom-Antigen Familie A, 4 (TT-Antigen 1.4)
Melan-A	engl. <i>melanocyte antigen</i> (=MART-1; engl. <i>Melanoma antigen recognized by T-cells 1</i>)
mDZ	reife Dendritische Zelle (engl. <i>mature dendritic cell</i>)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MIIC	MHC-Klasse-II-reiches Kompartiment (engl. <i>MHC-class II rich compartment</i>)
mLCL	Mini-EBV transformierte LCL
NY-ESO1	CTAG1B (TT-Antigen 6.1)
ODx	Optische Dichte der Wellenlänge x nm
ORF	Offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
p53	Proteinprodukt des TP53-Tumorsuppressor-Gens
PBL	Periphere Blut-Lymphozyten
PBMZ	Periphere mononukleäre Blutzellen (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PGE2	Prostaglandin E2
PI	Propidiumiodid
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
SSC	Seitwärtsstreuung (engl. <i>sideward scatter</i>)
SSX4	Synovial Sarcoma, X Bruchpunkt 4 (TT-Antigen 5.4)
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TAP	Transportprotein (engl. <i>transporter associated with antigen processing</i>)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β (engl. <i>transforming growth factor β</i>)

Th	T-Helfer-Zelle
TIL	Tumor-infiltrierender T-Lymphozyt
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (engl. <i>Toll-like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
TTA	Tumor-Testis-Antigen
TZR	T-Zell-Rezeptor
V-Segment	Variables Segment
VLE	sehr wenig Endotoxin (engl. <i>very low endotoxin</i>)
XAGE-1	X Antigen-Familie, Element 1 (TT-Antigen 12.1)
ZTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt

8 ANHANG

Tab. 8.1: Nukleotidsequenz des verwendeten pGEM-A116-Vektors (S. Milosevic)

5'-ATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAGACA^{HindIII}AGCTTCACGGATCCCACTCTAGAX^{bal}
 GACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAGCGGC
 CGCCACG^{EcoRI}AATTCAAA^{SpeI}C
 TAGTGGCGTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACTCTC
 AGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCC
 CTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATG
 TGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTTA
 TAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAA
 CCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCT
 TCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGG
 CATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGG
 GTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAA
 GAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCG
 GGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAG
 AAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAG
 TGCGGCCAACCTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGG
 GGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGT
 GACACCACGATGCCTGTAGCAATGCCAACACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTA
 GCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC
 CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTG
 CAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACT
 ATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGAC
 CAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCC
 TTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA
 AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCA
 CCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTC
 AGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT
 GTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCG
 TGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGG
 GTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTA
 TGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGA
 ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCG
 CCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATCGAAAAACGCCA
 GCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTAT
 CCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGA
 CCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCG
 CGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTCCCGACTCGAAAGCGGGCAGTGAGCG
 CAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGT
 ATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATG-3'

Restriktionsschnittstellensequenzen sind unterstrichen und die Schnittstelle ist **blau** eingezeichnet; T7-Promotorsequenz ist **rot** hervorgehoben.

Tab. 8.2: Nukleotidsequenz von pVA1-2-EBNA-1-TZR-A116

5'-TGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACACCCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAA
TCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACG
GGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGA
GGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTA
ATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTAT
TTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAA
CATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTATTCCCTTTTTTTCGCGCATTTTG
CCTTCCTGTTTTTGTCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACG
AGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTT
TCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGA
GCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCA
TCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGC
CAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATC
ATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC
ACGATGCCTGTAGCAATGCCAACACGTTGCACAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCC
GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCG
GCTGGCTGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACT
GGGGCCAGATGTTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGCGGGAGTCAGGCAACTATGGATG
AACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGAGCACTAAGTTTA
CTCATATATACTTTAGATTGATTTAACTTCACTTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATA
ATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCA
AAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACC
AGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAG
CGCAGATACCAATACTGTCCTTCTAGTGAGCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCAC
CGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTA
CCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTG
CACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAA
GCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAG
AGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTC
TGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATCGAAAAACGCCAGCAACGC
GGCCTTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTCATATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGAT
TCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCG
CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTG
GCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTCGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAA
TTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTG
TGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATAC
GACTCACTATAGGAGACAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGACTCTAGAGGATCCACCGGTGCGCCAGCA
TGTGGGGAGTGTTTCTGCTGTACGTGTCCATGAAGATGGGCGGCACCAACCGGCCAGAACATCGACCA
GCCACCGAGATGACCGCCACCGAGGGCGCCATCGTGAGATCAACTGCACCTACCAGACCAGCGGC
TTCAACGGCCTGTTCTGGTATCAGCAGCACGCCGGCGAGGCCCCACCTTCTGAGCTACAACGTGCT
GGACGGCCTGGAAGAGAAGGGCGGTTTACGAGCTTCTGAGCAGAAGCAAGGGCTACAGCTACCTG
CTGCTGAAAGAACTGCAGATGAAGGACAGCGCCAGCTACCTGTGCAGTGCAGTGCAGCTACAG
CGGCGCCGGCAGCTACCAGCTGACCTTCGGCAAGGGCACCAAGCTGAGCGTGATCCCAACATCCAG
AACCCCGAGCCCGCGCTGTACCAGCTGAAGGACCCAGAAAGCCAGGACAGCACCTTGTGCTGTT
CACCGACTTCGACAGCCAGATCAACGTGCCCAAGACCATGGAAGCGGCACCTTCATCACCAGACAAGA
CAGTGCTGGACATGAAGGCCATGGACAGCAAGAGCAACGGCGCCATTGCCTGGTCCAACAGACCCAG
CTTCACATGCCAGGACATCTTCAAAGAGACAAACGCCACCTACCCAGCAGCGACGTGCCCTGCGACG
CCACCCTGACCGAGAAGAGCTTCGAGACAGACATGAACCTGAATTTCCAGAACCTGAGCGTGATGGGC
CTGCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGAGCAGCT
GAGGTACCGAGCTCGAATTCATTTATTTATTTATTTACTCGAGCACGCTAGCCACGATATCAATTCAA
AA
AAA_{SpeI}CTAGTGGCG-3'

Restriktionsschnittstellensequenzen sind unterstrichen und die Schnittstelle ist **blau** eingezeichnet; T7-Promotorsequenz ist **rot** hervorgehoben.

Tab. 8.3: Nukleotidsequenz von pVB5-1-EBNA-1-TZR-A116

5'-CGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTT
 AACTTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC
 TATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAGCTTGCATGCCTGCAGGTC
 GACTCTAGAGGATCCACCGGTCGCCACCATGGGCAGCCGCCTGCTGTGCTGGGTGCTGCTGTGCCTG
 CTGGGCGCCGGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGACCCAGACCCCCGCTACCTGATCAAGACCCGCGGC
 CAGCAGGTGACTCTGAGCTGCAGCCCCATCAGCGGCCACCGCAGCGTGAGCTGGTACCAGCAGACC
 CCCGGCCAGGGCCTGCAGTTCCTGTTTCGAGTACTTCAGCGAGACCCAGCGCAACAAGGGCAACTTCC
 CCGGCCGCTTCAGCGGCAGGCAGTTCAGCAACAGCCGACGAGATGAACGTGAGCACCCCTGGAGC
 TGGGCGACAGCGCCCTGTACCTGTGC^{FspI}GCAAGCAGCTTCACCGGCCAGGGCTACAACGAGCAGTTC
 TTCGGCCCCCGGCACCCGCCTGACCGTGCTGGAGGATCTGAGGAACGTGACCCACCCAAG^{BstEII}GTGA
 CCCTGTTTCGAGCCCAGCAAGGCCGAGATCGCCAACAAGCAGAAAGCCACCCCTGGTCTGCCTGGCCAG
 GGGCTTCTTCCCCGACCACGTGGAGCTGTCTTGGTGGGTGAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGAGT
 CAGTACCGACCCCCAGGCCTACAAAGAGAGCAACTACAGCTACTGCCTGAGCAGCAGGCTGAGAGTG
 AGCGCCACCTTCTGGCACAACCCCCGGAACCACTTCCGGTGCCAGGTGCAGTTCACAGGCCCTGAGCG
 AAGAGGACAAGTGGCCTGAGGGCAGCCCCAAGCCCGTGACCCAGAACATCAGCGCCGAGGCCTGGG
 GCAGAGCCGACTGCGGCATCACCAGCGCCAGCTACCACCAGGGCGTGCTGTCCGCCACCATCCTGTA
 CGAGATCCTGTCTGGCAAGGCCACCCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGGCCTGGTGTGATGGCCATG
 GTGAAGAAGAAGAACAGCTGAGGTACCGAGCTCGAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA^{SpeI}CTAGTGGCGTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTG
 CGGTATTTTACACCCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCC
 CGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGAC
 AAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAG
 ACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAG
 GTGGCACTTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
 CCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAACATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACA
 TTTCCGTGTGCCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTG
 GTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG
 CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA
 TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAG
 AATGACTTGGTTGAGTACTACCCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT
 GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCG
 AAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGA
 GCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGCCAACAACGTTGC
 ACAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCGGA
 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGC
 CGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
 TTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCT
 CACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTT
 TTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTT
 GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGT
 AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCAGCTACCCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACC
 AACTCTTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGAGCC
 GTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCA
 GTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA
 GGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACAC
 CGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGAC
 AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCC
 TGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAG
 GGGGGCGGAGCCTATCGAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGGCC
 TTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGA
 GCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG
 CGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTT
 TCCCGACT-3'

Restriktionsschnittstellensequenzen sind unterstrichen und die Schnittstelle ist **blau** eingezeichnet; T7-Promotorsequenz ist **rot** hervorgehoben.

Tab. 8.4: Nukleotidsequenz von pVA17-M244-TZR-A116

5'-TGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAA
TCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACG
GGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGA
GGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTA
ATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTAT
TTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAA
CATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTTTG
CCTTCCTGTTTTTGTCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACG
AGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTT
TCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGA
GCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCA
TCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGC
CAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCA
TGTAATCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCA
CGATGCCTGTAGCAATGCCAACACGTTGCACAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG
GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGG
CTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTG
GGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA
CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACT
CATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAAT
CTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAA
GGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAG
CGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCG
CAGATACCAAACTGTCTTCTAGTGAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCG
CCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACC
GGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCA
CACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGC
GCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAG
CGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTG
ACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATCGAAAAACGCCAGCAACGCG
GCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATT
CTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCGAGCCGAACGACCGAGCGC
AGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGG
CCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTCGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAAT
TAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT
GGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCT**TAATACG**
ACTCACTATAGGGAGACAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCACTCTAGAGGATCCACCGGTGCGCCACCAT
GGAGACCCTGCTGGGCGTGAGCCTGGTGATCCTGTGGCTGCAGCTGGCCCGCGTGAACAGCCAGCA
GGGCGAGGAGGACCCCGAGGCCCTGAGCATCCAGGAGGGCGGAGAACGCCACCATGAACTGCAGCTA
CAAGACCAGCATCAACAACCTGCAGTGGTACCGCCAGAACAGCGGCAGGGGCTGGTGCACCTGATC
CTGATCCGCAGCAACGAGCGCGAGAACACAGCGGAGGCTGCGCGTGACCCTGGACACCCAGCAAG
AAGAGCAGCAGCTGCTGATCACCGCCAGCCGCGCGCCGACACCGCCAGCTACTTCTGCFspIGCAAC
CGACGACGGCGCCAACAGCAAGCTGACCTTCGGCAAGGGCATCACCTGAGCGTGCGCCCGACAT
CCAGAACCCCGAGCCCGCGTGTACCAGCTGAAGGACCCAGAACGACGAGCAGCACCCTDrallIGTGC
CTGTTACCCGACTTCGACAGCCAGATCAACGTGCCCAAGACCATGGAAAGCGGCACCTTCATCACCGA
CAAGACAGTGCTGGACATGAAGGCCATGGACAGCAAGAGCAACGGCGCCATTGCCTGGTCCAACCCAG
ACCAGCTTCACATGCCAGGACATCTTCAAAGAGACAAACGCCACCTACCCAGCAGCGACGTGCCCTG
CGACGCCACCCTGACCGAGAAGAGCTTCGAGACAGACATGAACCTGAATTTCCAGAACCTGAGCGTGA
TGGGCCTGCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGAG
CAGCTGAGGTACCGAGCTCGAATTA
AA
AA
AAAAAAAAAAAAAASpeICTAGTGCGC-3'

Restriktionsschnittstellensequenzen sind unterstrichen und die Schnittstelle ist **blau** eingezeichnet; T7-Promotorsequenz ist **rot** hervorgehoben.

Tab. 8.5: Nukleotidsequenz von pVB3-1-M244-TZR-A116

5'-TGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAA
 TCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACG
 GGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGA
 GGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTA
 ATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTGAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTAT
 TTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAA
 CATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTTTG
 CCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACG
 AGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTT
 TCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGA
 GCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCA
 TCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGC
 CAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATC
 ATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC
 ACGATGCCTGTAGCAATGCCAACACGTTGCACAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCC
 GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCG
 GCTGGCTGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACT
 GGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATG
 AACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGAGACCAAGTTTA
 CTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATA
 ATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCA
 AAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACC
 AGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAG
 CGCAGATACCAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCAC
 CGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTA
 CCGGGTTGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTG
 CACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAA
 GCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAG
 AGCGCAGGAGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTC
 TGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATCGAAAAACGCCAGCAACGC
 GGCTTTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGTGCGCTTTTGTGCTCACATGTTCTTTCCGTGTTATCCCCTGAT
 TCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCG
 CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTG
 GCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGGTTCCCGACTCGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAA
 TTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTG
 TGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATAC
 GACTCACTATAGGAGACAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGACTCTAGAGGATCCACCGGTGCGCCACCA
 TGGGCTGCCGCTGCTGTGCTGCGTGGTGTCTGCCTGCTGCAGGCCGCGCCCCCTGGACACCGCCG
 TGAGCCAGACCCCCAAGTACCTGGTGACGCAGATGGGCAACGACAAGAGCATCAAGTGCGAGCAGAA
 CCTGGGCCACGACACCATGTACTGGTACAAGCAGGACAGCAAGAAGTTCCTGAAGATCATGTTTCAGCT
 ACAACAACAAGGAGCTGATCATCAACGAGACCGTGCCCAACCGCTTCAGCCCCAAGAGCCCCGACAA
 GGCCACCTGAACCTGCACATCAACAGCCTGGAGCTGGGCGACAGCGCCGTGTAATCTGCG^{FspI}GCAA
 GCAGCCAGACCGGCTGGGAGACCCAGTACTTCGGCCCCGGCACCCGCTGCTGGTGCTGGAGGACC
 TGAGGAACGTGACCCCAACCAAG^{BstEII}GTGACCTGTTTCGAGCCAGCAAGGCCGAGATCGCCAACAA
 GCAGAAAGCCACCCTGGTCTGCCTGGCCAGGGGCTTCTTCCCCGACCACGTGGAGCTGTCTTGGTGG
 GTGAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGAGTCAGTACCGACCCCGAGGCTACAAAGAGAGCAACTACA
 GCTACTGCCTGAGCAGCAGGCTGAGAGTGAGCGCCACCTTCTGGCACAACCCCCGGAACCACTTCCG
 GTGCCAGGTGCAGTTCCACGGCCTGAGCGAAGAGGACAAAGTGGCCTGAGGGCAGCCCCAAGCCCGT
 GACCCAGAACATCAGCGCCGAGGCTGGGGCAGAGCCGACTGCGGCATCACCAGCGCCAGCTACCA
 CCAGGGCGTGCTGTCCGCCACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTG
 CTGGTGTCCGGCCTGGTGTGATGGCCATGGTGAAGAAGAAGAACAGCTGAGGTACCGAGCTCGAAT
 TCAAATAAAA
 AA^{SpeI}CTAGTGGCG
 -3'

Restriktionsschnittstellensequenzen sind unterstrichen und die Schnittstelle ist **blau** eingezeichnet; T7-Promotorsequenz ist **rot** hervorgehoben.

Tab. 8.6: Nukleotidsequenz des CrossTAq-Konstruktes

LAMP-1	5'-ATGGCCGCCCCCGGCAGCGCCC GCCGCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CTGGGCCTGATGCACTGCGCCAGCGCC-3'
DC-LAMP	5'-GACCCCAGCAGCGACTACACCATCGTGCTGCCCGT GATCGGCGCCATCGTTGGTGGGCC TGTGCCTGATGGGCATGGGCGTGTACAAGATCCGCCTGCGCTGCCAGAGCAGCGGCTAC CAGCGCATCTAA-3'

Tab. 8.7: Nukleotidsequenz des pGEM-CrossTA_g-Melan-A_(ELA)-A116-Vektors (C. Ellinger)

ATTACGCCAAGCTCTAATACGCGACTACTACTATAGGAGACAAAGCTTACACGGATCCCACTCTAGACGCCACC
ATGGCCGCCCCCGGACAGCGCCGCGCCGCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGCTG
ATGCACTGCGCCAGCGCCGCTAGCATGCCAAGAGAAGATGCTCACTTCATCTATGGTTACCCCAAGAA
GGGGCACGGCCACTCTTACACCACGGCTGAAAGAGCTGGGATCGGCATCCTGACAGTGATCCTG
GGAGTCTTACTGCTCATCGGCTGTTGGTATTGTAGAAGACGAAATGGATACAGAGCCTTGATGGATAAAA
GTCTTCATGTTGGCACTCAATGTGCCTTAACAAGAAGATGCCACAAGAAGGGTTTGATCATCGGGACA
GCAAAGTGTCTCTTCAAGAGAAAAACTGTGAACCTGTGGTTCCTAATGCTCCACCTGCTTATGAGAAAC
TCTCTGCAGAACAGTCAACCACCTTATTACCTGGTACCATCGATGACCCAGCAGCGACTACACC
ATCGTGCTGCCCCTGATCGGCGCCATCGTGGTGGGCTGTGCCTGATGGGCATGGGCGTGACAAG
ATCCGCCTGCGCTGCCAGAGCAGCGGCTACCAGCGCATCTAAAGCGGCGCCACGAATCAAAAAA
AAA
AAA^{Spel}CTAGTGGCGTGATGCGGTATTTT
CTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCG
CATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCC
GGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCAT
CACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAAT
GGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAA
ATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG
AGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGGCATTTGCTTCTGTTTTGC
TCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCG
AACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCA
CTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCGC
GCATACACTATTCTCAGATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCAT
GACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCGCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACA
ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGAT
CGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAAT
GCCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGAC
TGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGC
TGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCG
CTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATT
GATTTAAACCTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATC
CCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGAT
CCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTG
CCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGACAGAGCGCAGATACCAAATACT
GTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCT
CTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAG
ACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTG
GAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGA
AGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCT
TCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT
TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATCGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCC
TGCCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATT
ACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGC
GAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATCGAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCAGTTTCAATTAATGCA
GCTGGCAGCAGAGGTTTTCCGACTCGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTC
ACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT
AACATTTTACACAGGAAACAGCTATGACCATG

Restriktionsschnittstellensequenzen sind unterstrichen und die Schnittstelle ist **blau** eingezeichnet; **T7-Promotor**sequenz, das **ELAGIGILT-Epitop** und die **LAMP-1 bzw. DC-LAMP** Sequenzen sind hervorgehoben.

Restriktionsschnittstellensequenzen sind unterstrichen und die Schnittstelle ist **blau** eingezeichnet; **T7-Promotor**sequenz und das **FLAGIGILT-Epitop** sind hervorgehoben.

Tab. 8.7: HLA-Typisierungen

Spender	HLA-Loci									
	A	B	C	DRB1	DRB3	DRB4	DRB5	DQA1	DQB1	DPB1
#1	*01:01	*14:02	*07:01	*11:04	*02:02	n.t.	n.t.	*01:03	*03:01	*04:01
		*15:17	*08:02	*13:01		n.t.	n.t.	*05:05	*06:03	
#5	*01:01	*44:02	*05:01	*13:01	*02:02	n.t.	*01:01	*06:02	*06:03	*04:02
	*32:01			*15:01		n.t.				
BF	*0201	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
ME	*02:xx	*15:xx	*03:xx	*13:02	*03:01	negativ	*01:01	*01:02	*06:02	*03:01
	*29:xx	*24:xx	*16:xx	*15:01				*01:02	*06:04	*14:01
MRE	*02:01	*18:01	*05:01	*11:xx	*01:01	negativ	negativ	*01:03	*03:01	*04:xx
	*24:02	*44:02	*07:01	*13:xx	*02:02			*05:xx	*06:03	
MSC	*26:01	*18:01	*04:01	*15:01	n.t.	n.t.	*01:11	*01:02	*06:02	*04:01
	*68:01	*35:02	*07:01		n.t.	n.t.			*06:03	
MW	*02:xx	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
SJ	*24:02	*15:01	*03:03	*03:xx	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
		*35:08	*04:01	*11:xx	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

xx: es lag keine Feintypisierung vor, sondern nur eine mittlere Auflösung (zweistellig)

n.t.: nicht typisiert

DANKSAGUNG

Die Zeit während einer Doktorarbeit scheint selten eine Einfache zu sein und so habe auch ich in den letzten dreieinhalb Jahren einige Hürden nehmen müssen. Dabei standen mir viele Personen mit Rat und Tat zur Seite, denen ich nachfolgend herzlichst danken möchte.

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Elisabeth Weiß für die Vertretung meiner Arbeit vor der Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München, sowie die konstruktiven Diskussionen und hilfreichen Anmerkungen zu meiner Arbeit bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Slavoljub Milošević für die wissenschaftlich fundierte und umfangreiche Vorbereitung sowie die konzeptionelle Ausarbeitung dieser Dissertation. Für Fragen und Diskussionen stand er jederzeit zur Verfügung. Er hat nie an mir oder meiner Arbeit gezweifelt und immer an meinen Erfolg geglaubt, wofür ich ihm sehr dankbar bin. Sein Engagement und unermüdlicher Optimismus hat mir oft geholfen schwierige Zeiten zu überstehen.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Frau Prof. Dr. Dolores J. Schendel, die es mir ermöglichte, in ihrer Arbeitsgruppe meine Arbeit anzufertigen. Gemäß dem anfangs genannten Zitat von Steve Jobs lebt sie die Wissenschaft und ich hatte das Privileg in den letzten Jahren ein Teil davon zu sein. Trotz ihres sehr straffen Zeitplans stand ihre Türe immer offen für fachliche Fragen und Diskussionen. Ihrer bedingungslosen Unterstützung und aufbauenden Worte konnte ich immer Gewiss sein. Sie wird mir immer ein Vorbild sein.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich ganz herzlich für das sehr angenehme Arbeitsklima und die fortdauernde Hilfsbereitschaft und fachlichen Diskussionen bedanken. Insbesondere bei meinem Kollegen Christian Ellinger bedanke ich mich für die vielen produktiven Diskussionen, die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit und diverse Hilfestellungen. Des Weiteren bedanke ich mich vielmals bei Frau Dr. Silke Raffeggerst, ohne deren Hilfe ich die Mausexperimente nicht hätte durchführen können, sowie den Mitarbeitern vom Tierstall für die professionelle Versorgung unserer Tiere. Frau Dr. Susanne Wilde danke ich sehr herzlich für ihre immer währende Diskussionbereitschaft und Unterstützung bei so vielen Dingen. Bei Herrn Dr. Bernhard Frankenberger bedanke ich mich herzlichst für die Unterstützung hinsichtlich des Mausexperimentes und die ausdauernde und professionelle Korrektur meiner schriftlichen Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Barbara Mosetter, Frau Sabine Eichenlaub und Herrn Adam Slusarski ebenfalls recht herzlich für die fachliche und moralische Unterstützung bedanken. Allen anderen AG-Schendel-Mitgliedern danke ich für den Zusammenhalt innerhalb der Gruppe und dass ich jederzeit mit meinen Fragen auf offene und hilfsbereite Ohren gestoßen bin.

Frau Anna Brandl danke ich für die unzähligen Male, bei denen sie für mich Blutabnahmen durchgeführt hat.

In Sachen Durchflusszytometrie geht mein Dank an viele verschiedene Menschen, die nicht zögerten mir beizustehen: so bedanke ich mich bei Herrn Dr. Joachim Ellwart, Dr. Josef Mysliwietz, Dr. Judith Eckl, Isabel Römer sowie Dagmar Pich und Sebastian Tiedt.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Josef Mautner und Dr. Andreas Moosmann für ihre bedingungslose Unterstützung bezüglich der Bereitstellung verschiedenster Zelllinien.

Bei all meinen Gutachtern, die trotz ihrer knapp bemessenen freien Zeit sich bereit erklärt haben, Teil meines Prüfungskomitees zu sein gilt ebenfalls ein Dankeschön.

Bei Frau Dr. Anna Mender bedanke ich mich herzlich dafür, dass sie nie müde wurde mein Wehklagen zu ertragen und mir über die Jahre über das Arbeitsverhältnis hinaus eine sehr gute Freundin geworden ist.

Frau Prof. Dr. Elfriede Nößner und Frau Dr. Petra Prinz danke ich für das Engagement für uns Doktoranden im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Alle nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern danke ich vielmals für ihren Beitrag zum Zusammenhalt und die nicht für selbstverständlich gehaltene schöne Arbeitsatmosphäre innerhalb des IMI. Ich danke allen für die schöne Zeit am IMI.

Aus tiefstem Herzen danke ich meinen Mann Christian Wehner, der mir immer ein Fels in der Brandung war und mich in jeglicher Hinsicht immer bedingungslos und aufopferungsvoll unterstützt hat. Ohne seine moralische Unterstützung wäre ich so manches mal verzweifelt.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt meiner restlichen Familie, insbesondere meinen lieben Eltern, die mich in jeder Lebenslage unterstützten und auch in den letzten dreieinhalb Jahren meine Arbeit mit großem Interesse verfolgten.

Besonders danke ich auch meinem Opa, der schon immer eine besondere Stellung in meinem Leben eingenommen hat und der mich durch seine Krankheit in die Krebsforschung gebracht hat.

Nicht zuletzt danke ich meiner kleinen Schwester, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mit der es immer viel Spaß macht die englische Sprache zu üben.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Die Arbeit wird hiermit erstmalig einer Prüfungskommission vorgelegt. Diese Dissertation wurde von Frau Prof. Dr. Dolores J. Schendel am Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München, betreut und wird von Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß vor der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vertreten.

München den, 01.07.2013

(Carina Wehner)